

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Tamara ZORAN

**PRIMERJAVA EKSTRAKCIJSKIH METOD ZA  
IDENTIFIKACIJO PLESNI Z MASNO  
SPEKTROMETRIJO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Tamara ZORAN

**PRIMERJAVA EKSTRAKCIJSKIH METOD ZA IDENTIFIKACIJO  
PLESNI Z MASNO SPEKTROMETRIJO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**COMPARISON OF EXTRACTION METHODS FOR THE  
IDENTIFICATION OF MOULDS BY MASS SPECTROMETRY**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij, na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Tadejo MATOS, za recenzentko doc. dr. Polono ZALAR.

Mentorica: doc. dr. Tadeja MATOS, dr. med.

Recenzentka: doc. dr. Polona ZALAR, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za  
mikrobiologijo in imunologijo

Mentorica: doc. dr. Tadeja MATOS, dr. med.  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za  
mikrobiologijo in imunologijo

Recenzentka: doc. dr. Polona ZALAR, univ. dipl. biol.  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tamara Zoran

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)**

ŠD Du2  
 DK UDK 579.61:616-078:582.28:543.51(043)=163.6  
 KG glive/plesni/*Aspergillus*/Zygomycetes/diagnostika glivičnih  
 infekcij/mikoze/identifikacija plesni/konvencionalne metode/masna  
 spektrometrija/MALDI-TOF MS  
 AV ZORAN, Tamara, dipl. mikrobiol. (UNI)  
 SA MATOS, Tadeja (mentorica)/ ZALAR, Polona (recenzentka)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, študij mikrobiologije  
 LI 2015  
 IN PRIMERJAVA EKSTRAKCIJSKIH METOD ZA IDENTIFIKACIJO PLESNI Z  
 MASNO SPEKTROMETRIJO  
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)  
 OP IX, 62 str., 10 pregl., 11 sl., 2 pril., 83 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI Zadnja leta smo pričala porastu glivičnih infekcij, povzročenih s plesnimi rodu *Aspergillus* ter redu Mucorales. Omenjene plesni povzročajo težave predvsem pri imunsko oslabljenih posameznikih, kot so rakavi bolniki, bolniki z razvitim sindromom pridobljene imunske pomanjkljivosti-AIDS, sladkorni bolniki in bolniki, ki prejemajo kortikosteroide. Hitra in uspešna identifikacija povzročitelja mikoze je nujna za izbiro ustreznega antimikotika. V laboratorijih za diagnostiko glivičnih infekcij glive identificirajo na podlagi tradicionalnih metod, ki še vedno temeljijo na gojenju in sporulaciji plesni ter opazovanju makro- in mikromorfoloških značilnosti, zaradi česar identifikacijo lahko opravijo le izkušeni strokovnjaki. Slabost tovrstne metodike je tudi v tem, da je časovno potratna, zaradi česar skušajo v diagnostične laboratorije vpeljati nove tehnologije. Masna spektrometrija se že uspešno uporablja za identifikacijo kvasovk, medtem ko so za namen uspešne identifikacije plesni številne raziskave še v teku. Glavni problem predstavlja ekstrakcija beljakovin na račun rigidnih celičnih sten, od katere je odvisna učinkovitost same metode. V naši študiji smo primerjali metodo polne ekstrakcije, ki jo priporoča proizvajalec MALDI-TOF MS Bruker, z metodo delne ekstrakcije in neposrednim nanosom. Nobena od testiranih metod, niti priporočena, se ni izkazala kot primerna za identifikacijo. Od 73-ih izolatov plesni, ki smo jih uporabili v študiji in so pripadali vrstam, ki so vključene v komercialno podatkovno knjižnico, smo uspešno identificirali 57 izolatov in sicer z metodo polne ekstrakcije 27 izolatov, z metodo delne ekstrakcije 24 izolatov, z metodo neposrednega nanosa pa 6 izolatov plesni. Za ostalih 23 izolatov plesni, ki so pripadali vrstam, ki niso vključene v knjižnico pa je bila ta metoda po pričakovanjih neustrezna. V zadnjem delu naloge smo izvedli identifikacijo plesni *Aspergillus lentulus*, vrste, ki ni bila vključena v proizvajalčevo knjižnico. Identifikacija te plesni je bila uspešna po tem, ko smo ustvarili lastne masne spektre tega izolata in ga vnesli v že obstoječo proizvajalčevo knjižnico.

**KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)**

ND Du2

DC UDK 579.61:616-078:582.28:543.51(043)=163.6

CX fungi/moulds/*Aspergillus*/*Zygomycetes*/diagnostic of fungal infections/mycosis/identification of moulds/conventional methods/mass spectrometry/MALDI-TOF MS

AU ZORAN, Tamara

AA MATOS, Tadeja (supervisor)/ ZALAR, Polona (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2015

TY COMPARISON OF EXTRACTION METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF MOULDS BY MASS SPECTROMETRY

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO IX, 62 p., 10 tab., 11 fig., 2 ann., 83 ref.

LA sl

Al sl/en

AB In the recent years we have been witnessing an increase of fungal infections caused by moulds, such as *Aspergillus* spp. and Mucorales. Those moulds are especially harmful to people with weakened immune system (patients with cancer, AIDS, diabetes and patients receiving corticosteroids), so a quick and successful identification of the disease agent is crucial for an appropriate choice of antimycotic. Currently, the identification of moulds in diagnostic mycology laboratories is based on the traditional and conventional methods, which based on culture and sporulation moulds as well as on observation of the microscopic and macroscopic morphologic characteristics. Therefore identification of moulds with conventional methods is reliable only if they are performed by an experienced mycologist. Two crucial limitations when identifying fungal infections are also subjectivity and time restraints. Mass spectrometry hence presents an efficient, quick and objective alternative method for the identification of fungal cause of infections. MALDI-TOF MS has recently been discovered as a powerful tool for the identification of yeasts, but there is still ongoing research regarding the identification of moulds. The main problem present the protein extraction method, which is crucial for a successful identification. In our study we have compared the full protein extraction method, which is recommended by Bruker manufacturer, with a partial extraction method and direct surface method. Unfortunately, none of the methods has been proven useful for the identification in diagnostic mycological laboratory. In the second part of our study we have demonstrated the influence of a quality and extensive library is an important pillar for successful identification. Out of 73 isolates of moulds, which were used in our study and are a part of the commercial data library, we successfully identify 57 isolates, thereof 27 isolates have been identified with the full protein extraction method, 24 isolates with the partial extraction method and 6 isolates with the direct surface method. For the remaining 23 isolates, which were not presented in the commercial data library, the methods have been proven useless. In the final part of the research we have performed an identification of moulds *Aspergillus lentulus*, which is not included in the manufacturer's library. Identification of this mould has been successful after we had created our own mass spectrum of this isolate and included it in the manufacturer's library.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)</b> .....	<b>II</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)</b> .....	<b>III</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>VII</b>
<b>KAZALO PRILOG</b> .....	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
1.2 HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>3</b>
2.1 KLASIFIKACIJA MEDICINSKO POMEMBNEJŠIH PLESNI .....	3
2.2 EPIDEMIOLOGIJA .....	4
2.3 DEJAVNIKI TVEGANJA .....	5
2.4 PLESNI KOT POVZROČITELJI GLIVIČNIH OKUŽB .....	7
<b>2.4.1 Glive rodu <i>Aspergillus</i></b> .....	<b>7</b>
2.4.1.1 Značilnosti rodu .....	7
2.4.1.2 Mikroskopske lastnosti .....	8
2.4.1.3 Patogeneza .....	8
<b>2.4.2 Glive reda <i>Mucorales</i></b> .....	<b>10</b>
2.4.2.1 Značilnosti reda .....	10
2.4.2.2 Mikroskopske lastnosti .....	10
2.4.2.3 Patogeneza .....	11
<b>2.4.3 Manj pogosti povzročitelji mikoz</b> .....	<b>12</b>
2.4.3.1 Glive rodu <i>Fusarium</i> .....	12
2.4.3.2 Značilnosti rodu .....	12
2.4.3.3 Mikroskopske lastnosti .....	12
2.4.3.4 Patogeneza .....	13
2.5 CELIČNA STENA .....	13
2.6 VIRULENTNI DEJAVNIKI .....	17
2.7 DIAGNOSTIKA .....	20
<b>2.7.1 Konvencionalne metode</b> .....	<b>21</b>
<b>2.7.2 Molekularne metode</b> .....	<b>21</b>
<b>2.7.3 Masna spektrometrija</b> .....	<b>23</b>
2.7.3.1 Princip MALDI-TOF MS .....	23
2.7.3.2 Obdelava vzorcev ter interpretacija rezultatov .....	25
2.7.3.3 Prednosti in slabosti MALDI-TOF MS .....	26
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>28</b>
3.1 MATERIALI .....	28

<b>3.1.1 Vzorci</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.2 Gojišča</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 METODE</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.1 Predpriprava sevov</b> .....	<b>31</b>
3.2.1.1 Oživljanje kultur plesni.....	31
3.2.1.2 Gojenje plesni .....	31
<b>3.2.2 Priprava matriksa</b> .....	<b>31</b>
3.2.2.1 Priprava bakterijskega standarda (BST) .....	32
<b>3.2.3 Metoda polne ekstrakcije</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2.4 Neposredni nanos</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2.5 Delna ekstrakcija</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2.6 Analiza vzorcev ter interpretacija rezultatov</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2.7 Izdelava knjižnice</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2.8 Statistična obdelava rezultatov</b> .....	<b>35</b>
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>36</b>
4.1 REZULTATI IDENTIFIKACIJE IZOLATOV PLESNI, KI SO PRIPADALI VRSTAM, VKLJUČENIM V PODATKOVNO KNJIŽNICO .....	36
<b>4.1.1 Primerjava metod polne in delne ekstrakcije beljakovin</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1.2 Primerjava metode polne ekstrakcije beljakovin z neposrednim nanosom</b> .....	<b>39</b>
4.2 REZULTATI IDENTIFIKACIJE IZOLATOV PLESNI, KI SO PRIPADALE VRSTAM, KI NISO VKLJUČENE V PODATKOVNO KNJIŽNICO.....	42
4.3 VNOS REFERENČNEGA MASNEGA SPEKTRA V PODATKOVNO KNJIŽNICO	44
<b>5 RAZPRAVA</b> .....	<b>45</b>
5.1 METODA POLNE EKSTRAKCIJE .....	46
5.2 METODA DELNE EKSTRAKCIJE .....	47
5.3 NEPOSREDNI NANOS .....	47
5.4 PRIMERJAVA METOD POLNE IN DELNE EKSTRAKCIJE TER NEPOSREDNEGA NANOSA BELJAKOVIN .....	48
5.5 IDENTIFIKACIJA SEVOV, KI PRIPADAJO VRSTAM, KI NISO VKLJUČENE V PODATKOVNO KNJIŽNICO .....	49
5.6 VNOS REFERENČNIH MASNIH SPEKTROV V PODATKOVNO KNJIŽNICO ...	51
<b>6 SKLEPI</b> .....	<b>52</b>
<b>7 POVZETEK</b> .....	<b>53</b>
<b>8 VIRI</b> .....	<b>55</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Prednosti in slabosti konvencionalnih metod ter MALDI-TOF MS (Brandt in sod., 2011; Larone, 2011). .....	27
Preglednica 2: Seznam vseh uporabljenih rodov plesni. ....	28
Preglednica 3: Seznam vseh uporabljenih plesni, ki smo jih uporabili v študiji. ....	29
Preglednica 4: Primerjava pravilno identificiranih plesni z metodo polne in delne ekstrakcije beljakovin. ....	37
Preglednica 5: Seznam izolatov s pripadajočimi povprečnimi vrednostmi »log score« pri metodi polne in delne ekstrakcije beljakovin.....	38
Preglednica 6: Primerjava pravilno identificiranih plesni z metodo polne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa. ....	40
Preglednica 7: Seznam izolatov s pripadajočimi povprečnimi vrednostmi »log score« pri metodi polne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa. ....	41
Preglednica 8: Seznam uporabljenih plesni, ki niso vključene v proizvajalčevo podatkovno knjižnico.....	43
Preglednica 9: Primerjava povprečne vrednosti »log score« pri identifikaciji plesni z metodo polne in delne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa. ....	43
Preglednica 10: Povprečna vrednost »log score« pri metodi polne ekstrakcije beljakovin pri identifikaciji novo vnesenega izolata <i>Aspergillus lentulus</i> v podatkovno knjižnico.....	44



## KAZALO SLIK

Slika 1:	Prikaz filogenetskega drevesa pravih gliv na osnovi analize ribosomskih genov in drugih uveljavljenih taksonomskih molekularnih markerjev (Hibbet in sod., 2007: 515). ....	3
Slika 2:	Prikaz nespolnih razmnoževalnih struktur gliv rodu <i>Aspergillus</i> (Zalar in sod., 2012: 17).....	8
Slika 3:	Značilne morfološke strukture rodu <i>Rhizopus</i> (Ribes in sod., 2000: 251)...	11
Slika 4:	Prikaz tipičnih struktur, značilnih za plesni rodu <i>Fusarium</i> (Larone, 2011: 306). ....	13
Slika 5:	Shematski prikaz strukture celične ovojnice gliv (Vega in sod., 2011: 3). .	14
Slika 6:	Shematski prikaz razlik v sestavi celične stene pri kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in filamentozni glivi <i>Aspergillus fumigatus</i> (Latgé, 2007: 2).....	16
Slika 7:	Vpliv GAG glive <i>Aspergillus fumigatus</i> na prirojen (naravni) imunski odziv (Latgé in Beauvais, 2014: 5). ....	18
Slika 8:	MALDI-TOF MS Biotyper proizvajalca Bruker Daltonik (Bremen, Nemčija) (foto: Zoran T.). ....	24
Slika 9:	Stresalnik oziroma rotator za epruvete z navojem (foto: Zoran T.).....	32
Slika 10:	Prikaz povprečnih vrednosti »log score« pri identifikaciji plesni z metodo polne in delne ekstrakcije beljakovin plesni. ....	39
Slika 11:	Prikaz povprečnih vrednosti »log score« pri identifikaciji plesni z metodo polne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa. ....	42

**KAZALO PRILOG**

- Priloga A: Preglednica vseh uporabljenih sevov ter pripadajoče vrednosti »log score« za metodo polne ekstrakcije beljakovin.
- Priloga B: Preglednica vseh uporabljenih sevov ter pripadajoče vrednosti »log score« za metodo delne ekstrakcije beljakovin in neposrednega nanosa.

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

ABPA	alergijska bronhopulmonalna aspergiloza
AIDS	sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (angl.: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> )
BTS	bakterijski standard (angl.: <i>Bacterial Test Standard</i> )
CBS	oznake glivnih sevov iz zbirke gliv Centraalbureau voor Schimmelcultures - Fungal Biodiversity Centre
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl.: <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
ESI	elektrosprej masna spektrometrija (angl.: <i>Electrospray Ionization</i> ).
EXF	oznake glivnih sevov v Mikrobiološki zbirki ekstremofilnih mikroorganizmov Ex
FAB	hitro atomsko bombardiranje (angl.: <i>Fast Atom Bombardment</i> )
GAG	galaktozaminogalaktan
GalNac	N-acetilgalaktozamin
GPI	glikozilfosfatidilinozitol
HCCA	$\alpha$ -ciano-4-hidroksicinaminska kislina (angl.: <i><math>\alpha</math>-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> )
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti (angl.: <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
IL	interlevkin
ITS	regija vmesnega distančnika (angl.: <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
KOPB	kronična obstruktivna pljučna bolezen
Log score	vrednost, ki opisuje ujemanje masnih spektrov
m/z	razmerje mase in naboja
MALDI	ionizacija v matriksu z lasersko desoprcijo (angl.: <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i> )
MRIC-UL	mreža raziskovalnih infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani
MS	masna spektrometrija
NaOH	natrijev hidroksid
N-G1	oznake glivnih sevov izoliranih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij
O-G	oznake okoljskih izolatov izoliranih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij
pH	merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini
PNA FISH	<i>in situ</i> fluorescentna hibridizacija s peptidonukleotidnimi sondami (angl.: <i>Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization</i> )
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl.: <i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> )
TFA	trifluoroocetna kislina (angl.: <i>Trifluoroacetic Acid</i> )
TOF	čas potovanja (angl.: <i>Time of Flight</i> )
z	naboj

## 1 UVOD

Plesni so filamentozne glive, ki poleg kvasovk povzročajo pri ljudeh številne okužbe. Mikoze so takoimenovane okužbe z glivami in so lahko le estetski problem ali pa povzročajo številne zdravstvene težave, ki lahko vodijo celo v smrt. Ker je pravilna ter hitra identifikacija povzročitelja mikoze izrednega pomena za pravilno izbiro zdravljenja in s tem prognozo bolezni, je metoda, s katero identificiramo povzročitelja, odločilna. Pomembno je, da je ta hitra in zanesljiva, saj je izid bolezni ob zakasneli uvedbi zdravljenja pri bolnikih lahko zanje usoden. Identifikacija patogenih gliv temelji na morfološko-fizioloških značilnostih izolatov in molekularnih metodah, ki so drage ter dolgotrajne, ali pa zahtevajo izkušeno laboratorijsko osebje. Ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo (angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) je vrsta masne spektrometrije, ki omogoča hitro in zanesljivo identifikacijo bakterij in kvasovk. MALDI-TOF MS je nedestruktivna ionizacijska tehnika, pri kateri z laserjem obsevamo predhodno obdelan vzorec. Pri tem pride do sublimacije molekul matriksa ter prenos nehlapnih molekul polipeptida v plinsko fazo. V tej prihaja do trkov med ioni in molekulami ter nastanka protonov, ki pospešeno potujejo proti masnemu analizatorju. TOF (angl. *Time of Flight*) je najpreprostejši masni analizator, ki ločuje ione glede na njihovo hitrost potovanja v merilni cevi, po pospešitvi v električnem polju. Ta je odvisna od razmerja mase in naboja ( $m/z$ ). Ločene ione prepozna detektor, ki jih loči glede na maso ( $m$ ) in naboj ( $z$ ). Kot rezultat dobimo različne spektre, s katerimi lahko identificiramo mikroorganizem. Zaradi naravne odpornosti določenih vrst gliv proti antimikotikom je identifikacija do vrste izjemnega pomena za zdravljenje bolnikov. Velikokrat s konvencionalnimi metodami lahko identificiramo izolat le do nivoja rodu, kar pa v nekaterih primerih ni dovolj. MALDI-TOF MS predstavlja alternativo pri identifikaciji gliv v diagnostičnih laboratorijih. Omogoča namreč pravilno identifikacijo do nivoja vrste v kratkem času. Zaradi specifičnih strukturnih lastnosti plesni (debela in kompleksna celična stena) je sprostitev znotrajceličnih beljakovin otežena, s tem pa zmanjšana kakovost vzorca primerne za identifikacijo z metodo MALDI-TOF MS. S tem se posledično zmanjša verodostojnost identifikacije izolata plesni do nivoja vrste in razvije potreba po učinkovitih postopkih ekstrakcije znotrajceličnih beljakovin. Potrebna je posebna predpriprava vzorcev, tako imenovana ekstrakcija z mravljično kislino. Ta postopek je v večini primerov dolgotrajen ter ni standardiziran, zato se identifikacija plesni z metodo MALDI-TOF MS za zdaj še ne uporablja kot zlati standard v diagnostičnih laboratorijih. Zaradi vedno večjega števila bolnikov z oportunističnimi mikozami in visoke smrtnosti teh bolezni so raziskave na tem področju koristne. Ko bodo znanstveniki odkrili uspešno ekstrakcijsko metodo in jo standardizirali, bo identifikacija plesni do nivoja rodu oziroma vrste hitra, objektivna in učinkovita.

## 1.1 NAMEN DELA

- primerjati tri različne ekstrakcijske metode beljakovin za identifikacijo filamentoznih gliv iz kulture, z MALDI-TOF MS
- ugotoviti, ali je katera od preizkušanih metod identifikacije filamentoznih gliv iz kulture analizirana z MALDI-TOF dovolj specifična, občutljiva in hitra za uporabo v rutinski diagnostiki

## 1.2 HIPOTEZE

Pričakovali smo, da bo metoda polne ekstrakcije beljakovin po proizvajalčevih navodilih (Bruker Daltonik, Bremen, Nemčija) dala višji delež pravilno identificiranih vrst kot modificirani metodi - delna ekstrakcija in neposredni nanos.

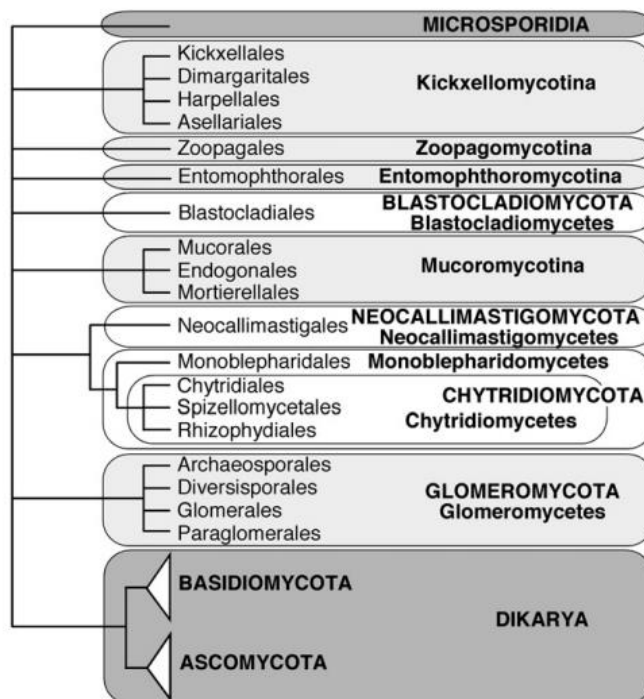
Prav tako smo pričakovali, da bo delna ekstrakcija uspešnejša kot neposredni nanos.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KLASIFIKACIJA MEDICINSKO POMEMBNEJŠIH PLESNI

Nitaste oziroma filamentozne glive, ki tvorijo večcelični micelij, imenujemo plesni. V splošnem glive spadajo v lastno kraljestvo, saj se od ostalih organizmov iz drugih kraljestev ločijo po več pomembnih značilnostih. Te zajemajo zgradbo celične stene, način prehranjevanja in razmnoževanja ter samo organizacijo organizma. Do zdaj je znanih in opisanih veliko več kot 100 000 vrst gliv. Z okužbami ljudi je povezanih manj kot 500 vrst. Približno 100 vrst ima sposobnost povzročiti okužbo pri ljudeh z normalno delujočim imunskim odzivom. Preostanek, torej 400 vrst, pa izzove bolezen pri osebah s pomanjkljivim imunskim odzivom (Brandt in sod., 2011). Kljub vsemu, ne smemo zanemariti ogromnega števila vrst, ki še niso bile opisane. Znanstveniki predvidevajo, da se na našem planetu lahko nahaja do 5,1 milijona vrst gliv (Blackwell, 2011).

Klasifikacija gliv je še pred nekaj leti temeljila predvsem na opazovanju morfologije spolnih razmnoževalnih struktur. Po odkritju molekularni metod pa je prišlo do nekaterih sprememb v klasifikaciji oziroma taksonomiji gliv. Glede na glivni slovar kraljestvo Fungi obsega 6 debel: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia ter Zygomycota (Kirk in sod., 2008).



Slika 1: Prikaz filogenetskega drevesa pravih gliv na osnovi analize ribosomskih genov in drugih uveljavljenih taksonomskih molekularnih markerjev (Hibbet in sod., 2007: 515).

Hibbet in sodelavci (2007) poročajo, da so glive, ki so pred razvojem molekularnih metod na podlagi morfoloških značilnosti spadale v deblo Zygomycota, na osnovi analiziranih molekularnih markerjev polifiletske. Edina filogenetsko jasno ločena skupina od prej uvrščenih gliv v deblo Zygomycota, je skupina endomikoriznih gliv, ki so jo premestili na nivo debla kot Glomeromycota, medtem ko ostalih še niso uvrstili v debla, in imajo zato oznako »*incertae sedis*«. Na sliki 1 so omenjene taksonomske skupine prikazane v svetlo sivih poljih. Po glivnem slovarju so poddebla »*incertae sedis*« Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Entomophthoromycotina in Zoopagomycotina (Kirk in sod., 2008). Eno izmed medicinsko pomembnejših poddebel je Mucoromycotina, v katero uvrščamo red Mucorales. Ta obsega večino za človeka patogenih rodov, kot so *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor* in *Rhizopus*. Nekatere glive iz redu Entomophthorales povzročajo obolenja tudi pri zdravih posameznikih, ki nimajo oslabiljenega imunskega sistema. To so predstavniki rodov *Basidiobolus* in *Conidiobolus*, ki povzročajo tropske podkožne mikoze, ki se pojavljajo na endemskih območjih, in so redke. Taksonomsko najobsežnejše deblo Ascomycota vključuje najpomembnejše povzročitelje mikoze, tako nekatere kvasovke (*Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*) kot tudi plesni (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*). Plesni rodu *Penicillium* praviloma ne povzročajo okužb, saj okužbe – peniciloze povzroča izključno ena vrsta, *P. marneffei*, ki lahko povzroča sistemske mikoze. Za mnoge predstavnike debla Ascomycota je značilno, da imajo spolni (teleomorf) ter nespolni (anamorf) stadij, kar se je odražalo tudi v dvojnem poimenovanju gliv, saj je vsaka od teh dveh oblik imela svoje ime. Primer anamorfnege rodu je *Histoplasma*, primer teleomorfnege pa *Ajellomyces*. Plesni rodu *Aspergillus*, ki imajo prav tako spolni in nespolni stadij, so klasificirane kot anamorf in so včasih spadale v skupino »Deuteromycota«, ki je bila izključno praktične narave in nikoli ni imela filogenetskega pomena. Teleomorfi rodu *Aspergillus* so bili razdeljeni v 7 rodov znotraj redu Eurotiales. Medicinsko pomembna sta oba stadija. Tako je npr. teleomorf vrste *A. fumigatus* *Neosartorya fumigata* (Brandt in sod., 2011). Danes se glive poimenujejo po spremenjenih pravilih Mednarodnega kodeksa nomenklature za alge, glive in rastline, po katerem ima vsaka vrsta glive izključno eno ime. Za vrste rodu *Aspergillus* se še odločajo, ali bodo to imena teleomorfne ali anamorfne rodov (Samson in sod., 2014).

Tudi v debelu Basidiomycota najdemo glive, ki povzročajo okužbe pri ljudeh. Najpomembnejše so bazidiomicetne kvasovke, ki pripadajo rodovom *Cryptococcus*, *Malassezia* in *Trichosporon* (Brandt in sod., 2011).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIJA

Glive so ubikvitarni mikroorganizmi, ki jih najdemo skoraj povsod po svetu, tako v tleh, vodi in zraku, kot v razpadajočem materialu. Za epidemiologijo invazivnih glivičnih okužb je značilna geografska in časovna spremenljivost. Incidenca teh okužb povsod po svetu

narašča in tako predstavlja pomemben dejavnik komplikacij pri hospitaliziranih bolnikih (Brown, 2011).

Najpogostejše glive, ki povzročajo invazivne mikoze pri ljudeh, so glive iz rodu *Candida*. Povzročajo približno 70 % vseh mikoz, glavni povzročitelj je *Candida albicans*, sledijo ji *C. glabrata*, *C. tropicalis* ter *C. parapsilosis* (Delaloye in Calandra, 2014; Morace in Borgi, 2010). O invazivnih glivičnih okužbah, ki jih povzročajo plesni, govorimo kadar iz običajno sterilnih mest, tkiv in telesnih tekočin, izoliramo filamentozne glive kot so *Aspergillus*, *Fusarium* in Mucorales (Montagna in sod., 2013). Med njimi so najpogostejši povzročitelji plesni vrste *Aspergillus fumigatus*, ki povzročajo 10-20 % vseh invazivnih mikoz pri ljudeh. Glive rodu *Aspergillus* povzročajo invazivno aspergilozo, ki je postala eden izmed glavnih vzrokov smrti pri bolnikih z oslabljenim imunskim odzivom. Umrljivost pri bolnikih z invazivno aspergilozo je od 40 do 90 %. Prizadeti so predvsem bolniki po presaditvi krvotvornih matičnih celic, jeter, pljuč in srca (Kim, 2010; Simčič in Matos, 2010).

Bolezni, ki jih povzročajo oportunistične glive, so torej vedno bolj pogoste in dandanes obsegajo 15 % vseh bolnišničnih okužb (Delaloye in Calandra, 2014; Brown, 2011). Mikoze so še posebej problematične na oddelkih za intenzivno terapijo, predvsem zaradi povečane ter nesmotrne uporabe antibiotikov in invazivnih zdravniških posegov (Meersseman in Wijngaerden, 2007; Russo in sod., 2011). Porast mikoz so opazili predvsem pri imunsko oslabljenih bolnikih, katerih število se v zadnjih letih povečuje. K večji incidenci pripomore tudi daljše preživetje bolnikov, ki so oboleli za smrtnimi boleznimi ter selektivni pritisk širokospektralnih kemoterapavtikov, ki se uporabljajo v namene profilakse ali zdravljenja (Brown, 2011). Zadnja leta poročajo o porastu okužb, ki jih povzročajo plesni kot so *Mucor*, *Lichtheimia*, *Rhizopus* in drugi predstavniki bivšega razreda Zygomycetes. Nekateri znanstveniki menijo, da je glavni razlog povečana uporaba antimikotika vorikonazola (Malani in Kauffman, 2007), ki je zdravilo izbora za zdravljenje invazivne aspergiloze. Zgoraj omenjene plesni so namreč odporne proti vorikonazolu. Raziskave so pokazale, da je pri bolnikih z levkemijo oziroma pri bolnikih z visokim tveganjem odstotek okuženih posameznikov 3-8 %. Najpogostejši povzročitelj mukormikoz (zigomikoz) je plesen *Rhizopus arrhizus*, ki predstavlja 70 % vseh identificiranih vzorcev oziroma primerov mukormikoz. Invazivne glivične okužbe, povzročene z drugimi vrstami gliv, na primer *Fusarium*, so pri bolnikih na intenzivnih oddelkih redkejša (Ibrahim in sod., 2011; Tortorano in sod., 2011).

### 2.3 DEJAVNIKI TVEGANJA

Okužbe, ki jih povzročajo glive, so lahko lokalne ali sistemske. Lokalne okužbe se pojavljajo na koži, nohtih, lasišču, na sluznicah v ustni votlini ali vagini. Za njimi zbolevalo tako ljudje z okrnjenim imunskim odzivom, kot tudi imunsko kompetentni ljudje. Povzročitelji mikoz pri slednjih so dermatofiti, kamor sodijo glive iz rodov



*Trichophyton*, *Microsporon* in *Epidermophyton* in vrste iz rodu *Candida* (Sugar, 2008). Za nekatere okužbe, ki jih povzročajo glive iz rodu *Candida*, je značilno, da nastanejo ob porušenih normalni mikrobioti, ki je posledica dolgotrajnejšega jemanja antibiotikov, ali če lokalni fizikalni pogoji zaradi povečane vlažnosti in maceriranja kože omogočijo prekomerno razrast gliv in vnetni odgovor nanje (Sullivan in sod., 2005).

Primarno patogene vrste povzročajo okužbe pri osebah z normalno delujočim imunskim sistemom. Sem sodijo tudi glive, ki povzročajo endemske mikoze, ki sodijo v rodove *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides* in *Paracoccidioides*. Histoplazmozo povezujejo s ptiči in netopirji, zato so posebej ogroženi ljudje, ki raziskujejo jame, kmetje, veterinarji in delavci na terenu. Glive rodov *Blastomyces* in *Coccidioides* se nahajajo v tleh, razpadlem lesu, vegetaciji, ki se razkraja, in tako predstavljajo tveganje za okužbo pri ljudeh, ki delajo v kmetijstvu oziroma na prostem (Sullivan in sod., 2005).

Glive, ki so komenzali (vrste rodu *Candida*), so del normalne mikrobiote ljudi in tako kot oportunisti (*Candida*, *Aspergillus*) povzročajo okužbe, kadar pride do zmanjšane delovanja imunskega sistema oziroma porušena normalno prisotne mikrobiote (Sullivan in sod., 2005). Kot sem že omenila v prejšnjem poglavju, so najpogostejši povzročitelji mikoz med plesnimi glive rodu *Aspergillus*. Te povzročajo med drugim tudi invazivno aspergilozo, za katero so najbolj ogrožene imunsko oslABLJENE osebe, kot so na primer bolniki z daljšimi obdobji nevtropenije, bolniki po presaditvi krvotvornih matičnih celic ali čvrstih organov, bolniki okuženi z virusom HIV oziroma razvitim sindromom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS), ter bolniki s prirojeno imunsko pomanjkljivostjo, kot je kronična granulomatozna bolezen (Rementeria in sod., 2005). Največji dejavniki tveganja za okužbo in razvoj mukormikoze so slabo vodena sladkorna bolezen in druge oblike metabolične acidoze, zdravljenje s kortikosteroidi ter presaditev krvotvornih matičnih celic ali čvrstih organov ter maligne bolezni (Ibrahim in sod., 2011).

Večje tveganje za razvoj oportunističnih glivičnih okužb imajo tudi bolniki, ki se zdravijo na intenzivnih oddelkih, kjer imajo običajno več dejavnikov tveganja hkrati. Med njimi so pomembni uvedeni žilni katetri, ki predstavljajo tveganje za vdor predvsem vrst rodu *Candida* s kože v krvožilni sistem, mehanska ventilacija, hemodializa, parenteralna prehrana, večji kirurški posegi, zlasti na področju trebušne votline, prejemanje kortikosteroidov, ki oslabijo imunski odziv organizma, prejemanje širokospektralnega antibiotičnega zdravljenja (Kim, 2010).

Najpogostejši povzročitelji oportunističnih sistemskih mikoz so glive rodu *Candida*, *Aspergillus*, glive bivšega debla *Zygomycota* ter glive rodu *Fusarium* (Sugar, 2008). Zadnje tri spadajo med plesni in so predstavljene v naslednjih poglavjih.

## 2.4 PLESNI KOT POVZROČITELJI GLIVIČNIH OKUŽB

### 2.4.1 Glive rodu *Aspergillus*

Plesni rodu *Aspergillus* so ene izmed najpogostejših in najbolj razširjenih gliv na svetu. Glede na morfološko in genetsko podobnost jih delimo na različne skupine oziroma sekcije. S konvencionalnimi metodami lahko identificiramo izolat le do sekcije. Sekvenciranje ITS regije rDNA je zlati standard za identifikacijo patogenih plesni. Rod *Aspergillus* lahko s sekvenciranjem ITS regije identificiramo le do nivoja sekcije (Chalupová in sod., 2014).

Priporočljivo je, da klinični laboratoriji sporočajo identifikacijo izolata kot člana določene sekcije. V sekcijo spadajo vrste, ki so si morfološko ali biokemijsko podobne in jih s konvencionalnimi metodami in/ali sekvenciranjem ITS regije ne moremo razlikovati (Alastruey-Izquierdo in sod., 2012).

Sama identifikacija povzročiteljev glivičnih okužb do rodu *Aspergillus* v laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij ni tako zelo zahtevna, težave se pojavijo pri identifikaciji na nivoju vrste, še posebej kadar imamo opravka z »atipičnimi« vrstami ter slabo sporulirajočimi organizmi (Patterson, 2011).

Najpogostejše vrste, ki povzročajo invazivne okužbe, spadajo v naslednje sekcije: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* ter *A. terreus* sekcija (Patterson, 2011).

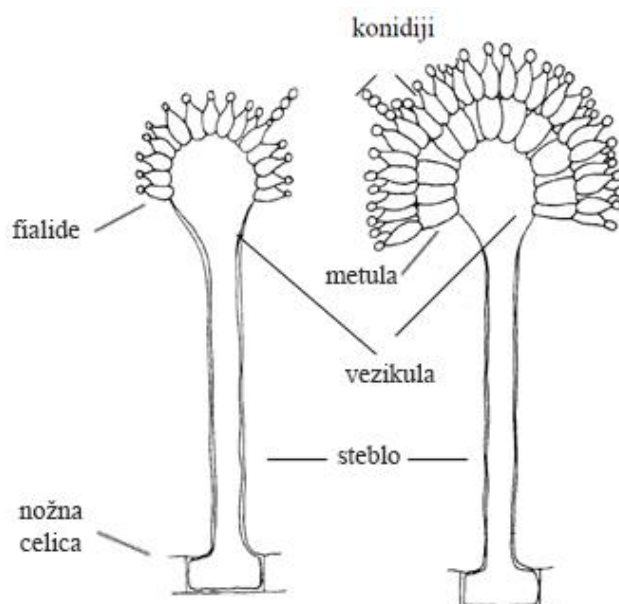
#### 2.4.1.1 Značilnosti rodu

Glive rodu *Aspergillus* so oportunistično patogene glive. Patogene vrste aspergilov niso zahtevne glede rasti, saj hitro rastejo na različnih substratih. Patogene izolate ločimo od nepatogenih po sposobnosti rasti pri 37 °C. *A. fumigatus* lahko raste celo pri temperaturah do 50 °C. Po tej lastnosti ga lahko ločimo od drugih vrst gliv znotraj rodu *Aspergillus* (Patterson, 2011). V splošnem je za te plesni značilna hitra rast, kolonije običajno sporulirajo v treh dneh. Nekatere vrste pa lahko rastejo tudi počasneje. Kolonije so na začetku bele in sčasoma sporulirajo ter se posledično različno obarvajo. Barva kolonij je specifična glede na vrsto. Značilni so različni zeleni odtenki, rumene, oranžne, rjave in črne barve. Ozadje kolonij je ponavadi belo, zlato ali rjavo (Larone, 2011).

Znanstveniki opažajo, da so določene vrste pridobile odpornost proti antimikotikom. Tako je znano, da je proti amfotericinu B odporna plesen *A. terreus*. Odpornost proti omenjenemu antimikotiku pa lahko kažejo tudi *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. lentulus*, *A. ustus* ter *A. glaucus*. Te plesni sicer niso absolutno odporne kot *A. terreus*, temveč kažejo naravno povišane MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) (Patterson, 2011).

### 2.4.1.2 Mikroskopske lastnosti

Pod mikroskopom ločimo glive rodu *Aspergillus* po naslednjih značilnostih: septirane hife, ki v premeru meriju od 2,5 do 8,0  $\mu\text{m}$ . Konidiofori so nerazvejani in se pravokotno na micelij dvigajo iz posebnih septiranih hif, imenovanih »nožne celice«. Na koncu konidiofora je vidna terminalna zadebelitev, ki se imenuje vezikula. Vezikula je prekrita s posebnimi konidiogenimi celicami, imenovanimi fialide. Te celice so stekleničaste oblike in lahko prekrivajo del oziroma celotno vezikulo. Če konidiogene celice izhajajo neposredno iz vezikule govorimo o enoplastnih aspergilih. V primeru, da fialide izhajajo iz vmesnih podpornih celic oziroma tako imenovanih metul, govorimo o dvoplastnih aspergilih. Na fialidah nastajajo enocelični konidiji, ki so običajno okrogli, gladki ali zrnati in tvorijo bazipetalne verižice (Larone, 2011). Konidiji so nespolne spore in so močno hidrofobni ter različno pigmentirani. Nekatere anamorfne vrste aspergilov lahko tvorijo črne konidije, ki vsebujejo melanin (Guarro in sod., 2010).



**Slika 2:** Prikaz nespolnih razmnoževalnih struktur gliv rodu *Aspergillus* (Zalar in sod., 2012: 17).

Na sliki (slika 2) sta prikazana enoplastni (levi) ter dvoplastni (desni) aspergil. Pri obeh so na vidne fialide iz katerih izhajajo konidiji. Pod stebлом je struktura imenovana "nožna celica" (Zalar in sod., 2012).

### 2.4.1.3 Patogeneza

Glive rodu *Aspergillus* povzročajo širok spekter različnih okužb, oblika bolezni pa je odvisna predvsem od imunskega statusa okužene osebe. Okužbe z omenjenimi glivami se pri imunsko kompetentnih posameznikih kažejo kot kolonizacija, lokalne okužbe pljuč, sinusov, sluhovoda, alergijske reakcije ter kot preobčutljivostna bolezen pljuč, tako

imenovana alergijska bronhopulmonalna aspergiloza. Zadnja je najpogostejša pri atopikih. Posebna oblika kolonizacije dihalnih poti je nastanek tako imenovanega aspergiloma. Nastane zaradi kolonizacije poškodovane pljučne votline oziroma bronhijev. Gre za nekakšen klobčič hif, ki se običajno nahaja v pljučni votlini, lahko pa se vrašča tudi v stene drugih telesnih votlin kot so na primer sinusi, sluhovod ter zgornja čeljust. Nastane lahko kot posledica že obstoječe okužbe oziroma bolezni kot so tuberkuloza, histoplazmoza, in sarkoidoza, ki puščajo anatomske votline, v katerih se počasi razraste aspergilom, na tankem peclju, ki predstavlja primarno mesto kolonizacije. K nastanku aspergilomov lahko prispevajo tudi emfizemske bule (prostori zapolnjeni z zrakom), kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB) ter v redkih primerih pljučnica povzročena z *Pneumocystis jirovecii*. Prisotnost aspergilomov je lahko asimptomatska in se jo diagnosticira naključno. Najpogosteje pa se izraža kot kroničen kašelj, ki ga lahko spremlja tudi izkašljevanje krvi, hemoptiza. V 26 % vseh primerov se ob pojavu hemoptiz bolezen konča s smrtnim izidom (Patterson, 2011). Pri osebah s pomanjkljivim imunskim odzivom *Aspergillus* spp. najpogosteje povzroča invazivno pljučno aspergilozo, ki se lahko širi lokalno v mediastinum ali hematogeno v druge organe, pogosto je pri tem prizadet centralni živčni sistem (Desoubeaux, 2013; Patterson, 2011).

Najpogostejši način okužbe z *Aspergillus* spp. je inhalacija konidijev, ki se nahajajo v zraku. Kadar ti prodrejo preko dihalne poti v pljuča in pri posamezniku ni mogoč učinkovit imunski odziv z monociti in nevtrofilci, se razvije invazivna pljučna aspergiloza (Larone, 2011). Kaže se kot suh in napredujoč kašelj, dispneja in bolečina v prsih ter vročina, ki je prisotna navkljub zdravljenju s širokospektralnimi antibiotiki. Povišana telesna temperatura ni nujno prisotna pri bolnikih, ki prejemajo kortikosteroide (Patterson, 2011). Vdihovanje spor gliv rodu *Aspergillus* lahko pri bolnikih z osnovnimi pljučnimi boleznimi, kot je KOPB, cistična fibroza, astma povzroči hudo poslabšanje zdravstvenega stanja (Kawel in sod., 2011).

Pri okužbah sinusne votline so najpogosteje okuženi maksilarni sinusi. Okužba se kaže v sinusitisu, izcedku, zamašenosti sinusov ter bolečini. Najpogostejša povzročitelja sta *A. fumigatus* ter *A. flavus*. Otomikoza je površinska kolonizacija ušes, pogosto povzročena z vrstama *A. niger* in *A. fumigatus*. Najpogostejša znaka okužbe sta vnetje, izcedek ter bolečina v ušesu. V ušesnem kanalu se lahko vidijo konidiofori glive *A. niger* celo s prostim očesom. Okužba nohtov z *Aspergillus* spp. se imenuje onihomikoza. Gre za glivično okužbo, ki je običajno kronična. Za razliko od kvasovk je odziv na zdravljenje z antimikotiki precej slabši. Alergijska bronhopulmonalna aspergiloza (ABPA) je kronični alergijski odgovor na kolonizacijo z *Aspergillus* spp. Običajno se razvije pri bolnikih z astmo, kot posledica inhalacije konidijev. Ta manifestacija okužbe, se pojavi pri več kot 14 % bolnikov z od steroidov odvisno astmo ter pri 7 % bolnikov s cistično fibrozo. Pri bolnikih s cistično fibrozo, je kolonizacija z glivami rodu *Aspergillus* še posebej nevarna v primeru presaditve pljuč, saj lahko pride do razvoja invazivne pljučne aspergiloze (Patterson, 2011).

## 2.4.2 Glive reda Mucorales

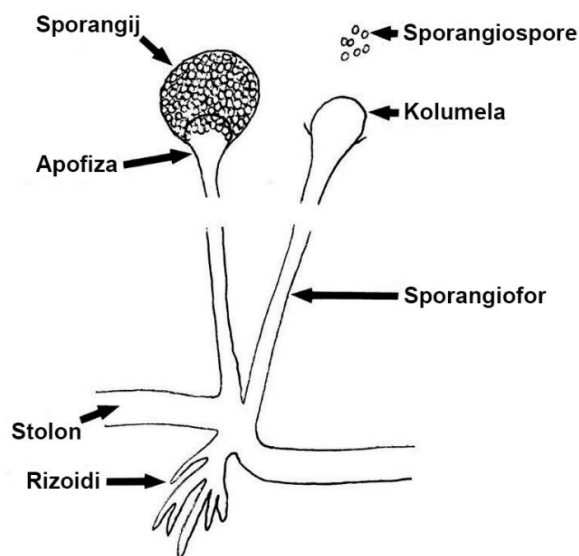
Zigomikoze oziroma mukormikoze povzročajo naslednje glive: *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* sp., *Lichtheimia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Saksenaea vasiformis*, *Cunninghamella bertholletiae*. *Basidiobolus* in *Conidiobolus* spp., povzročata subkutane zigomikoze imenovane entomoftoramikoze (Larone, 2011).

### 2.4.2.1 Značilnosti reda

V red Mucorales spadajo termotolerantni ubikivirni mikroorganizmi. Rastejo lahko na kruhu, zelenjavi, sadju in semenih oziroma na razpadajočem organskem materialu. Prav tako jih lahko najdemo v tleh, kompostu ter živalskih iztrebkih. Red Mucorales prepoznamo po sivkastih in puhastih kolonijah, ki zelo hitro prekrijejo petrijevke. Večina teh gliv zelo dobro raste na substratih, ki vsebujejo enostavne ogljikove hidrate. Skoraj vse vrste pa za svojo rast potrebujejo substrate z visoko vodno aktivnostjo (Ibrahim in sod., 2011). Zigomicete so preproste filamentozne glive s cenocitičnim micelijem. Septe so sicer lahko prisotne, vendar redko. Odsotnost sept omogoča hitro potovanje hranil in organelov (mitohondrij in jedro) v času rasti, absorpcijo hranil ter nastajanje spor (Larone, 2011). Značilna je obilna in hitra rast ter sporulacija kultur v 2-5 dnevih. Spore, ki jih tvorijo se prenašajo po zraku, zato so lahko pogosti kontaminanti v diagnostičnih laboratorijih v primeru nedoslednega aseptičnega dela (Ibrahim in sod., 2011).

### 2.4.2.2 Mikroskopske lastnosti

Glavne morfološke lastnosti gliv redu Mucorales, ki povzročajo okužbe pri ljudeh, so široke hife (v premeru 5-25  $\mu\text{m}$ , v povprečju 12  $\mu\text{m}$ ), ki ne rastejo vzporedno. Hife so redko septirane s tankimi stenami, zato so posledično zvite, delno kolabirane in zlomljene. Vejanje ni dihonomno, temveč nepravilno pod različnimi koti (včasih tudi pod pravim kotom) na starševsko hifo. Lahko so prisotne tudi klamidospore (Larone, 2011).



**Slika 3:** Značilne morfološke strukture rodu *Rhizopus* (Ribes in sod., 2000: 251).

Na sliki 3 so prikazane značilne strukture rodu *Rhizopus*, na katere moramo biti pozorni pri identifikaciji s konvencionalnimi metodami (Ribes in sod., 2000).

Rodove med seboj lahko ločujemo na podlagi:

- prisotnosti/odsotnosti ter lokacije rizoidov (koreninam podobni izrastki),
- razvejanju oziroma odsotnosti le tega pri sporangioforih,
- oblike kolumele (majhno območje podobno kupoli na apeksu sporangiofora),
- prisotnosti apofize (širjenje v bližini apeksa na sporangioforu),
- velikosti in obliki sporangijev (Larone, 2011).

Teleomorfna oblika producira zigospore (spolne spore). Gre za debelostenske preživetvene strukture, ki merijo v premeru običajno več kot 30  $\mu\text{m}$ . Čeprav nekatere vrste plesni iz družine Mucoraceae tvorijo zigospore, tradicionalna klasifikacija temelji na nespolnem razmnoževanju (anamorfu). Tipične razmnoževalne strukture, ki jih opazujemo pod mikroskopom, so sporangiospore, to so nespolne spore, ki nastajajo v sporangiju (Pitt in Hocking, 2009).

#### 2.4.2.3 Patogeneza

V primerjavi z glivami, kot sta *C. albicans* ter *A. fumigatus*, pri predstavnikih reda Mucorales zaenkrat še ni veliko znanega o določenih značilnosti gliv, ki vodijo do učinkovite okužbe gostitelja, ter imunskega odziva (Binder in sod., 2014). Povzročajo nekroze ter občasno tudi granulomatozne reakcije. Tudi za mukormikoze, podobno kot za invazivno aspergilozo, je značilno, da so posledica invazije stene krvnih žil, kar pomeni, da poškodujejo stene krvnih žil, posledično to vodi do tromboze, zapore žil in nekroze ali odmrtja tkiva (Larone, 2011).

Okužba z glivami reda Mucorales lahko privede do razvoja različnih oblik bolezni, ki je odvisen od mesta vstopa plesni oziroma od osnovne bolezni in splošnega stanja bolnika. Poznamo različne klinične manifestacije bolezni: rinocerebralna, pljučna, kožna, gastrointestinalna ter diseminirana oblika mukormikoze (Ibrahim in sod., 2011).

Pri bolnikih z iztirjeno sladkorno boleznijo in pri bolnikih, ki se zdravijo zaradi malignih hematoloških bolezni, kot so levkemije, limfomi in so močno imunsko oslabljeni, se običajno razvije rinocerebralna mukormikoza. Pri slednjih se lahko pojavijo tudi druge oblike bolezni, kot so pljučna ali razširjena okužba. Vzrok za razvoj pljučne in rinocerebralne oblike mukormikoze je inhalacija spor. Vstopno mesto za razvoj omenjenih oblik mukormikoz so dihala. Možni so tudi drugi načini okužbe, tako v primeru direktnega kontakta s kožo lahko pride do razvoja lokalne okužbe kože, zaužitje spor pa lahko vodi do gastrointestinalne oblike mukormikoze pri imunsko zelo oslABLjenem gostitelju. Najpogostejša oblika zigomikoze je rinocerebralna oblika, ki predstavlja tretjino do polovico vseh primerov mukormikoz in prizadene večinoma diabetične bolnike s ketoacidozo (70 %) in hematoonkološke bolnike (Ibrahim in sod., 2011).

### **2.4.3 Manj pogosti povzročitelji mikoz**

#### 2.4.3.1 Glive rodu *Fusarium*

Saprofitne plesni rodu *Fusarium* najdemo predvsem v tleh. Znani so predvsem kot rastlinski patogeni in kvarljivci hrane. Najdemo jih na sadju in zelenjavi, kjer povzročajo gnilobo, ter v žitnih izdelkih. Do zdaj je znanih več kot 50 vrst, od tega 12 vrst povezujejo z okužbami pri ljudeh. Najpogostejši povzročitelj okužb je *Fusarium solani*, ki povzroča približno 50 % vseh primerov. Sledijo *F. oxysporum* (20 %) ter *F. verticillioides* (10 %) in *F. moniliforme* (1 %). Redke vrste, ki prav tako lahko povzročajo okužbe pri ljudeh so *F. dimerum*, *F. proliferatum* ter druge (Garnica in Nucci, 2013).

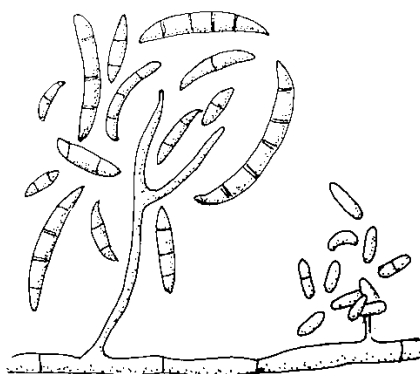
#### 2.4.3.2 Značilnosti rodu

Za glive rodu *Fusarium* je značilna hitra sporulacija (4 dni). Kolonije so bombažne in sprva bele, vendar se hitro razvije roza ali vijoličen center. Nekatere vrste ostanejo bele, spet druge so lahko v oranžnih do rjavkastih odtenkih. Posebna vrsta je *F. solani*, za katero so značilne modro-zelene ali modro-rjave kolonije ter razvoj gruč konidiogenih celic. Ozadje kolonij je običajno belo, vendar se lahko obarva tudi temno (Larone, 2011).

#### 2.4.3.3 Mikroskopske lastnosti

Ta rod plesni ima septiran micelij ter 2 tipa konidijev (slika 4). Konidiji nastajajo na konidioforih, ki so neseptirani in kratki ter rastejo iz micelija posamično ali v šopih. Prvi tip konidijev se imenujejo makrokonidiji in v širino merijo 2-6  $\mu\text{m}$ , v dolžino pa 14-80  $\mu\text{m}$ .

Ti konidiji so septirani (3-5 sept) ter srpaste oziroma čolničaste oblike in so na sliki (slika 4) prikazani na levi strani. Mikrokonidiji so elipsoidne oblike in manjši (2-4 x 4-8  $\mu\text{m}$ ) ter običajno enocelični, lahko tudi dvocelični. Pri nekaterih vrstah lahko opazimo tudi klamidospore (zadebelitve iz micelija) (Larone, 2011).



**Slika 4:** Prikaz tipičnih struktur, značilnih za plesni rodu *Fusarium* (Larone, 2011: 306).

Značilne strukture po katerih prepoznamo plesni rodu *Fusarium*, so makrokonidiji, ki so čolničaste oblike, ter enocelični oziroma dvocelični mikrokonidiji (Larone, 2011).

#### 2.4.3.4 Patogeneza

Te vrste plesni povzročajo okužbe tako pri imunsko nekompetentnih kot pri zdravih, imunsko kompetentnih posameznikih. Najpogostejše oblike pri imunsko kompetentnih so keratitis (*F. solani*) ter onihomikoze (*F. oxysporum*). Klinična slika okužbe pri ljudeh z oslajenim imunskim odzivom pa je odvisna predvsem od obsega same okužbe ter v kolikšni meri je prizadet imunski sistem. Bolezen je pogosto smrtna. Najpomembnejša dejavnika tveganja za razvoj okužb glivami rodu *Fusarium* sta nevtropenija ter deficit limfocitov T (Garnica in Nucci, 2013). V zadnjih letih so opazili povečano število primerov razširjenih sistemskih okužb pri nevtropeničnih bolnikih. Število primerov invazivne fuzarioze narašča predvsem v južni Ameriki. Do zdravstvenih težav lahko pride tudi preko uživanja kontaminiranih žitaric, saj nekatere vrste rodu *Fusarium* lahko tvorijo mikotoksine. V tem primeru lahko pride do zastrupitev, ki se najpogosteje kaže kot slabost in bruhanje (Larone, 2011).

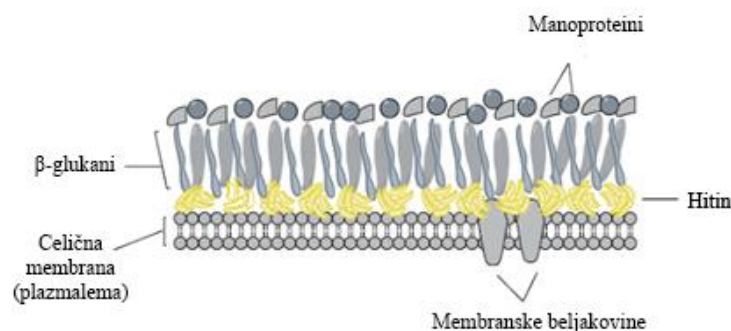
## 2.5 CELIČNA STENA

Zaradi oteženega dostopa do hranil, sprememb v osmolarnosti, pH vrednosti, temperaturi ter izpostavljenosti toksičnim komponentam, je gostitelj za rast in razvoj gliv precej neugodno okolje (Malavazi in sod., 2014). Če bi odstranili oziroma oslabili celično steno, bi organizem preživel le v primeru, da je zaščiten pred osmozo. Ker celična stena vsebuje veliko hidrolitičnih in toksičnih molekul, ki glivi omogočajo preživetje v nekem okolju,



lahko rečemo, da ima tudi agresivno oziroma za gostitelja uničujočo plat. Pomembna lastnost celične stene je rigidnost, ki glivi omogoča oziroma olajša penetracijo v različne substrate (Latgé, 2007).

Celična stena je kompleksna in dinamična struktura ter predstavlja prvo obrambno linijo (začetna bariera), hkrati pa ima pomembno vlogo tudi pri morfologiji, razvoju in virulenci gliv (Malavazi in sod., 2014). Zaradi prilagajanja na okolje se lokalizacija in vsebnost polisaharidov v celični steni nenehno spreminjata, kar glivam omogoča, da se izognejo imunskemu sistemu gostitelja (Latgé in Beauvais, 2014). Znanstveniki menijo, da so za dinamiko glede sestave celične stene odgovorna glikozilfosfatidilinozitolnega (GPI) sidra, saj je jedro celične stene (glukani, hitin in glikoproteini) pri večini gliv podobno oziroma enako (Latgé in Beauvais, 2014).



**Slika 5:** Shematski prikaz strukture celične ovojnice gliv (Vega in sod., 2011: 3).

Celična ovojnica gliv je sestavljena iz celične membrane, ki poleg fosfolipidov vsebuje različne membranske beljakovine in celične stene na površini, ki jo sestavljajo manoproteini, glukani ter hitin (Netea in sod., 2008). V notranjem sloju celične stene tako najdemo pretežno polisaharide, medtem ko v zunanem sloju prevladujejo beljakovine. Nekatere vrste gliv lahko v celični steni vsebujejo tudi različne pigmente, kot je na primer melanin. Glavne komponente celične stene so torej hitin, glikoproteini ter  $\beta$ - in  $\alpha$ -glukani (vsebnost teh je odvisna od vrste glive) (Goldman in Vicencio, 2012).

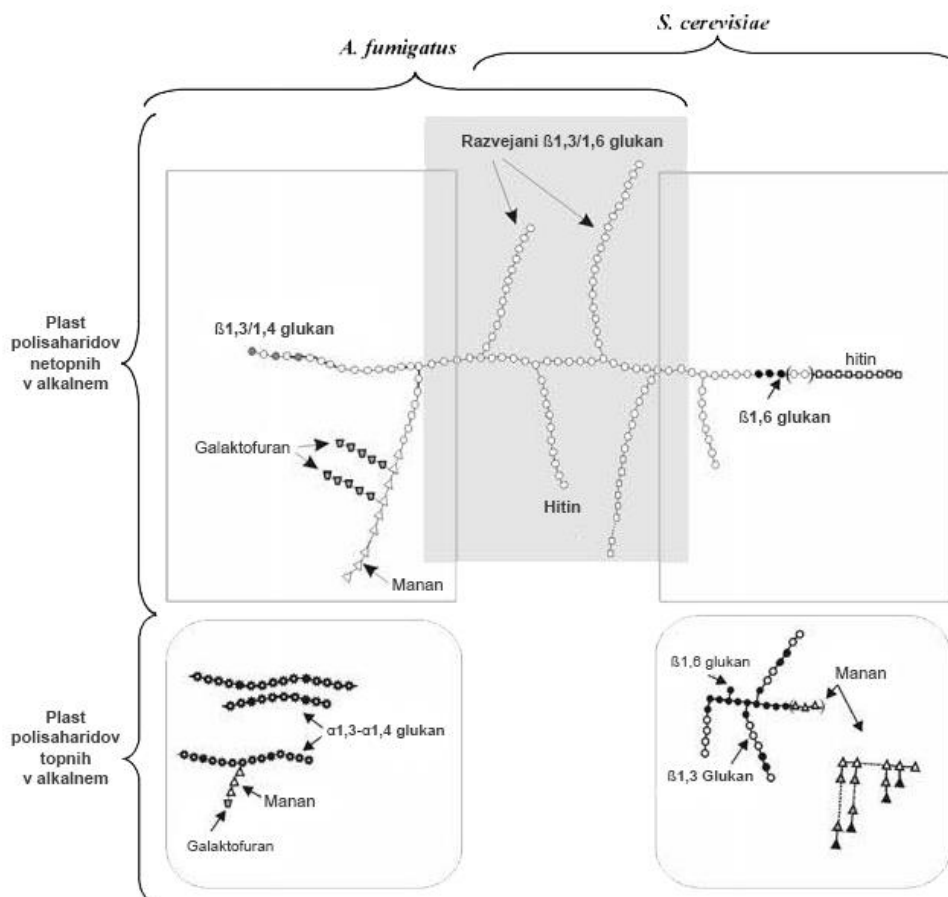
Hitin je polimer N-acetilglukozamina in je osnovna komponenta celične stene pri glivah (Goldman in Vicencio, 2012). Ima pomembno vlogo pri aktivaciji oziroma spodbujanju imunskega odziva gostitelja (Lenardon in sod., 2010). Človeški imunski sistem je s pomočjo posebnih encimov hitinaz sposoben prepoznati ter razgraditi hitin (Vega in Kalkum, 2012). Hitin torej nima le strukturne vloge pri celični steni, temveč je pomemben tudi pri patogenezi gliv (Goldman in Vicencio., 2012).

Glikoproteini so beljakovine, ki so kovalentno vezane na glikanski del. Najdemo jih na zunanem delu celične stene in igrajo pomembno vlogo pri virulenci in adheziji gliv. Ločimo jih na integralne ter periferne beljakovine celične stene. Primer perifernih

beljakovin so hidrofobini in jih najdemo v celični steni konidijev. Integralne beljakovine celične stene so lahko zasidrane preko GPI sidra v celično membrano ali pa se dodajo oziroma vključijo v matriks celične stene (Latgé, 2007; Netea in sod., 2008).

Polisaharide v celični steni lahko ločimo na dve plasti: v alkalnem topni oziroma netopni polisaharidi. Integralni del celične stene predstavljajo polisaharidi topni v alkalnem in ga gradijo razvejani  $\beta$ -1,3 ter 1,6-glukani. Ti so kovalentno vezani na hitin preko  $\beta$ -1,4 vezi. Sestava tega sloja je specifična glede na razred oziroma rod. Sloj, v katerem so alkalno netopni polisaharidi, pa kot nekakšen interkalirajoč cement povezujejo prej omenjene fibrile med seboj (Latgé, 2007). Sestava tega sloja je specifična glede na razred oziroma rod. V notranjem sloju so tako predvsem linearne verige  $\alpha$ (1-3)-glukanov, znotraj teh z  $\alpha$ (1-4) vezjo povezane glukozne enote, na vsako stoto glukozo vezano z  $\alpha$ (1-3) vezjo, galaktomaman in galaktozaminogalaktan (GAG). Skupna lastnost vsem glivam v strukturi celične stene je vezava  $\beta$ (1,3)-glukana na hitin z  $\beta$ (1,4) vezjo (Fontaine in sod., 2011; Fontaine in sod., 2000).

Latgé in Beauvais (2014) poročata o razlikah v sestavi celične stene konidijev in micelija pri glivi *A. fumigatus*. Konidiji so infektivne in razmnoževalne strukture, ki jih glive tvorijo v stresnih razmerah. Vegetativni micelj pa je za razliko od konidijev invaziven in občutljiv na stresne razmere. Notranji sloj celične stene micelija oziroma konidijev se v sestavi polisaharidov ne razlikuje, opazne pa so razlike v zunanem sloju. Pri glivi *A. fumigatus* najdemo na površini konidijev melanin in posebno beljakovino imenovano hidrofobin (Aimanianda in sod., 2009).



**Slika 6:** Shematski prikaz razlik v sestavi celične stene pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* in filamentozni glivi *Aspergillus fumigatus* (Latgé, 2007: 2).

Integralni del celične stene je kemijsko gledano sestavljen iz razvejanih  $\beta$ -1,3-glukanov, ki so povezani s hitinom (Latgé, 2007). Na sliki (slika 6) je v sivem kvadratu prikazan integralni del celične stene, ki je pri večini gliv podobno. Kompleksi grajeni iz hitina in glukana so na druge polisaharide povezani s kovalentno vezjo. Sestava le-teh v celični steni je odvisna od vrste glive. Najpogostejša povzročitelja mikoz se v celični steni razlikujeta predvsem po vsebnosti glukanov. Filamentozna gliva *A. fumigatus* vsebuje  $\beta$ -1,3- in  $\beta$ -1,4-glukane, ter  $\alpha$ -1,3-glukane (Latgé, 1999). Celično steno kvasovke *C. albicans* pa sestavljajo predvsem  $\beta$ -1,3-glukani ter  $\beta$ -1,6-glukani (Netea in sod., 2008).

Celična stena je pomemben celični organel tako za preživetje in virulenco gliv kot za diagnostiko in zdravljenje. Razumevanje funkcij komponent celične stene ter poznavanje njene sestave je izjemno velikega pomena pri razvijanju novih antimikotikov, kot pri razvijanju hitrih in specifičnih diagnostičnih metod za detekcijo povzročiteljev mikoz.

## 2.6 VIRULENTNI DEJAVNIKI

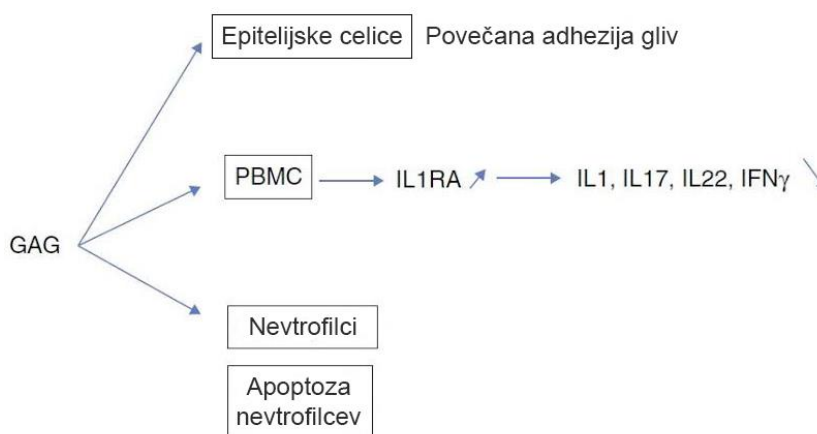
Razumevanje virulentnih dejavnikov je pomembno ne le za odkrivanje novih diagnostičnih metod povzročitelja, temveč tudi za razvoj novih učinkovitih antimikotikov (Krishnan in Askew, 2014). Patogenost gliv je odvisna od vrste seva ter imunskega statusa bolnika. Pri glivah do zdaj še niso odkrili virulentnih dejavnikov, ki bi bili enotni za razvoj in virulenco plesni (Rementeria in sod., 2005).

Rementeria in sodelavci (2005) povezujejo virulenco glive *A. fumigatus* z naslednjimi skupinami molekul oziroma genov:

- **Toksini:** asp-hemolizin, ribotoksin, gliotoksin, fumigaklavin C, aurasperon, helvolična kislina.
- **Alergeni:** Asp f1 in Asp f23.
- **Encimi:** alkalna serin-proteaza (Alp in Alp2), metaloproteaza (Mep), fosfolipaza C in B, dipeptidil-peptidaza (DppIV in DppV).
- **Pomembni encimi, ki sodelujejo pri oksidativnem stresu:** katalaze, superoksid dismutaze, peroksidaze.
- **Komponente celične stene:**  $\beta$ (1-3)-glukani, galaktomanani, galaktomananoproteini (Afmp1 in Afmp2) ter hitin-sintaze (Chs; *chsE* in *chsG*) in druge.
- **Molekule, ki omogočajo izmikanje imunskemu odzivu:** hidrofobini (RodA), dihidroksinaftalen DHN-melanin.

Latgé in Beauvais (2014) menita, da so polisaharidi pomembni virulentni dejavniki, saj se njihova vsebnost in sestava v celični steni nenehno spreminjata in sta odvisni od številnih stresnih dejavnikov. Za patogenezo plesni *A. fumigatus* je nujna sinteza  $\alpha$ -1,3-glukana (Beauvais in sod., 2013). Študije so pokazale, da inhibicija encimov, ki sintetizirajo polisaharide, lahko povzroči propad glive (Latgé, 2007). Polisaharidi celične stene zavirajo imunski odziv gostitelja, nekateri ( $\beta$ -glukani in  $\alpha$ -glukani) pa lahko celo ščitijo pred okužbami z glivo *A. fumigatus* oziroma pred okužbami z drugimi mikroorganizmi (Fontaine, 2011). Izločanje hidrofobinov ter prisotnost melanina zmanjšuje izpostavljenost  $\beta$ -1,3-glukanov imunskemu odzivu gostitelja (Chai in sod., 2010; Carrion in sod., 2013).

Fontaine in sodelavci (2011) poročajo o polisaharidu GAG, adhezinu, ki deluje kot antigenska molekula.



**Slika 7:** Vpliv GAG glive *Aspergillus fumigatus* na prirojen (naravni) imunski odziv (Latgé in Beauvais, 2014: 5).

Slika 7 prikazuje, kako GAG prispeva k virulenci plesni preko adhezije na epitelijske celice ter imunosupresivnega delovanja. Znana sta dva protivnetna mehanizma GAG. Omenjen adhezin inhibira protivnetne celice T pomagalke (Th1) in sintezo citokinov Th17 preko induciranja antagonista interlevkinskega-1 receptorja (IL-1Ra). Torej zavira normalno delovanje imunskega sistema, saj imajo celice Th1 in Th17 nalogo odstranjevanja določenih patogenov. GAG oziroma njegovi derivati zaradi indukcije IL-1Ra kažejo potencial pri zdravljenju bolezni, ki ji posreduje IL-1. Drugi mehanizem protivnetnega delovanja pa pripomore pri zmanjševanju infiltracije nevtrofilcev tekom okužbe pljuč. GAG inducira apoptozo nevtrofilcev, ki poteka s pomočjo naravnih celic ubijalk (NK-celic), in se tako izogne imunskemu odzivu (Latgé in Beauvais, 2014).

Epitop oziroma molekula, ki je del antigena GAG in jo prepozna imunski sistem, je N-acetilgalaktozamin (GalNAc). Vloga GAG je posredovanje vezave glive na plastiko, fibronektin in epitelijske celice gostitelja. Lahko pa tudi zavira vnetni odziv tako, da zamaskira  $\beta$ -glukane v celični steni in jih dektin-1 ne more prepoznati. GAG nima zaščitne funkcije temveč deluje imunosupresivno tako, da inducira apoptozo nevtrofilcev, ki so ključni pri zaščiti pred patogenom. Omenjen polisaharid tvorijo tudi druge vrste gliv *Aspergillus* in drugi rodovi gliv, kot na primer: *Penicillium*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Rhizopus* in *Helminthosporium* (Gravelat in sod., 2013; Fointaine in sod., 2011).

Galaktomanan je izvencelični antigen, imunoglobulin, ki ga najdemo v celični steni konidijev in hif. Njegova vloga je prenos hranil in ionov, pomemben pa je tudi pri vezavi konidijev na gostiteljske celice. Galaktomanan je najbolj uporaben diagnostični kazalec, ki ga določamo pri osebah z invazivno aspergilozo (Rementeria in sod., 2005).

Točna vloga hitina v povezavi z imunskim sistemom še ni popolnoma razjasnjena (Goldman in Vicencio, 2012). Nishimura in sodelavci (1986) so v raziskavi pokazali, da hitin spodbuja imunski odziv oziroma inducira izražanje interlevkina-1 in poveča sintezo

protiteles. V nasprotju s prej omenjenim, pa Reese in sodelavci (2007) ter Van Dyken in sodelavci (2011) menijo, da hitin sproži povečano akumulacijo eozinofilcev in bazofilcev. Wagner in sodelavci (2010) pa so v svoji študiji pokazali, da ima hitin protivnetne lastnosti in zavira proliferacijo T-celic.

Hidrofobin (RodA) je majhna hidrofobna beljakovina, ki obdaja površino konidijev glive *A. fumigatus*. Ima pomembno vlogo pri maskiranju površine  $\beta$ -glukanov v roženici tekom keratitisa. Hidrofobine najdemo le na površini konidijev in so izjemno odporni na kemijsko razgradnjo. Znanstveniki so pokazali, da se z odstranitvijo beljakovine RodA ter izbrisom gena (*rodA*), ki nosi zapis za prej omenjeno beljakovino, poveča izpostavljenost površinskih  $\beta$ -glukanov v konidijih (Carrion in sod., 2013).

Encimi in toksini delujejo na človeške celice sinergistično in/ali aditivno. Delujejo direktno ali pa pomagajo pri vdoru glive v gostitelja tekom okužbe (Rementeria in sod., 2005). Glive rodu *Aspergillus* sintetizirajo širok nabor toksinov. Nekateri od teh toksinov povzročajo mikotoksikoze (zastrupitve z kontaminirano hrano) ali pa se tvorijo v gostitelju in imajo pomembno vlogo pri patogenezi. Med zadnje spadajo gliotoksin, fumagilin in helvolična kislina, ki jih najdemo v hifah glive *A. fumigatus*. Zadnja dva toksina sta nujna za poškodbo gostiteljevih imunskih celic ter sluznic. Gliotoksin pa je najbolj preučen ter najmočnejši toksin plesni *A. fumigatus*. Aflatoksin je hepatotoksičen, kancerogen in teratogen mikotoksin, ki ga izdelujeta vrsti *A. flavus* in *A. parasiticus* (Guarro in sod., 2010).

Za vdor v pljučni epitelij, razgradnjo organskega materiala ter človeških tkiv, plesni izločajo zunajcelične encime. Primer so elastaze, te cepijo elastin, ki je glavna strukturna komponenta pljuč. Elastaze pa ne cepijo le elastina, temveč tudi kolagen, laminin, fibrinogen ter druge komponente pljučnega matriksa. Aktivnost oziroma koncentracija elastaz se razlikuje glede na vrsto gliv *Aspergillus*. Tako ima *A. flavus* 10-krat nižjo koncentracija elastaz, pri vrsti *A. niger* pa je koncentracija teh encimov tako majhna, da je ne povezujejo z virulenco (Guarro in sod., 2010).

Drugi encimi, ki jih tvori *A. fumigatus* in so lahko vpleteni v patogenezo, so hemolizini (npr. Asp-hemolizin), ki povzročijo lizo eritrocitov in imajo citotoksični učinek na makrofage in endotelijske celice. Histidin kinaza je encim, ki je pomemben pri odgovoru na stres in s tem povezanimi spremembami osmolarnosti, odpornosti na fungicide (npr. dikarboksimidi) ter regulacijo oziroma tvorbo celične stene. Pomembni so tudi encimi, ki sodelujejo pri oksidativnem stresu. Katalaze so encimi, ki omogočajo pretvorbo vodikovega peroksida do vode in kisika in tako ščitijo vse anaerobne organizme pred vodikovim peroksidom (Guarro in sod., 2011). Shibuya in sodelavci (2006) poročajo o treh katalazah pri vrsti *A. fumigatus*. Katalaze se tvorijo v konidijih (1) ter hifah (2). Konidijska katalaza igra pomembno vlogo pri izpostavljenosti visokim temperaturam, težkim kovinam, detergentom in vodikovemu peroksidu. Superoksid dismutaze so zunajcelični ter

znotrajcelični encimi, ki jih najdemo v citoplazmi ter celični steni konidijev in hif. Tudi ti encimi so del obrambe pred kisikovimi reaktivnimi zvrstmi. Njihova vloga je kataliza pretvorbe superoksidnega radikala v vodikov peroksid in vodo (Guarro in sod., 2010).

Bowyer in Denning (2007) menita, da ima večina alergenov glive *A. fumigatus* proteolitično aktivnost. Proteaze glivam olajšajo širjenje med tkivi, saj poškodujejo alveolarni epitelj. Vežejo se na receptorje alveolarnih makrofagov in tako sprožijo vnetni odziv. Alergene, ki jih tvori *A. fumigatus*, povezujejo z preobčutljivostnimi reakcijami kot sta astma in preobčutljivostna reakcija na glive ter alergijska bronhopulmonalna aspergiloza. Vendar za zdaj še ni popolnoma razjasnjeno, katere alergene s proteazno aktivnostjo tvorijo glive med okužbo oziroma invazijo v gostiteljska tkiva. Do zdaj najbolj raziskana poznana alergena sta tako imenovana metaloproteaza (Mep) in serin-proteaza (Alp). Znano je, da prisotnost metaloproteaze Mep (Aspf5) in serin-proteaze Alp1 (Aspf13) v pljučnih alveolarnih celicah in epitelnih celicah bronhijev vpliva na sproščanje protivnetnih citokinov, IL-6 in IL-8 (Farnell in sod., 2012).

Pomembna sposobnost, ki je bistvena za večino patogenih gliv, je prilagajanje na tropske razmere. Znano je, da *A. fumigatus* za ohranjanje svoje virulence potrebuje mehanizme s katerimi privzema iz okolja železo (siderofori), fosfor in hranila kot je na primer dušik (Rementeria in sod., 2005).

## 2.7 DIAGNOSTIKA

Število primerov invazivnih mikoze, ki jih povzročajo plesni narašča. Zaradi tega je hitra in uspešna identifikacija povzročitelja ter primerna izbira antimikotika ključnega pomena za izid bolezni. Zaenkrat so v diagnostičnih laboratorijih uveljavljene konvencionalne metode, ki temeljijo na fenotipskih značilnostih in fizioloških testih gliv (Liao in sod., 2012). Zdravniki postavijo diagnozo glivičnih okužb na osnovi kliničnih znakov in simptomov ter z laboratorijskimi preiskavami. Med konvencionalne diagnostične preiskave sodijo neposredni mikroskopski pregled, osamitev in morfološko-fiziološka identifikacija povzročitelja ter serološke preiskave (Matos, 2011).

Neposredni mikroskopski pregled je ena izmed najenostavnejših metod diagnostike glivičnih okužb. Poznamo različne načine priprave mikroskopskega preparata: vzorec lahko obdelamo z kalijevim hidroksidom in opazujemo s svetlobnim mikroskopom v temnem polju ali pa s faznokontrastnim mikroskopom, lahko ga barvamo z indijskim črnilom (prikaz kaspule kriptokokov) ali pa preparat fiksiramo na objektno stekelce in barvamo s fluorescenčnimi barvili ali po Gramu. Na podlagi mikroskopiranja lahko ugotovimo, ali je mikroorganizem v kliničnem vzorcu patogen oziroma gre le za kontaminanta. Negativni neposredni mikroskopski izvid ne izključuje glivične okužbe, zato je v vsakem primeru potrebna kultura kliničnega materiala, osamitev gliv in identifikacija. Serološka diagnostika ni primerna metoda za vse glivične okužbe.

Zanesljiva je predvsem za histoplazmozo in kokcidioidomikozo, za druge pa lahko rezultati le nakazujejo oziroma podpirajo diagnozo glivične okužbe. Serološke teste izvajamo predvsem pri kriptokokozah, aspergilozah, kandidozah in histoplazmozah. Pogosti so lažno negativni rezultati, saj je pri okuženih osebah nivo antigenov zelo nizek (Matos, 2011). Novejši diagnostični postopki temeljijo na detekciji in analizi glivne DNA oziroma beljakovin v kliničnih vzorcih. Te metode so še v razvoju, saj zaenkrat še niso dovolj uspešne pri vseh vrstah gliv ter standardizirane kot konvencionalne, zagotovo pa predstavljajo velik napredek v diagnostičnih laboratorijih (Brandt in sod., 2011)

### 2.7.1 Konvencionalne metode

Večino gliv lahko identificiramo na podlagi gojenja. Osnovno gojišče za gojenje gliv iz kliničnih vzorcev je Sabourad-ov agar. Ta lahko vsebuje antibiotike in cikloheksimid, kar onemogoči rast bakterij in saprofitnih plesni. Optimalna temperatura rasti večine patogenih gliv je okrog 30 °C. Inkubacija kliničnih vzorcev tako poteka pri 25-30 °C in 37 °C. Veliko gliv raste počasi, zato traja inkubacija od 10 do 20 dni, včasih tudi dlje (Matos, 2002). Najpogostejša povzročitelja *C. albicans* in *A. fumigatus* razvijeta zrele kolonije v 1-3 dnevih (Brandt in sod., 2011). Identifikacija s konvencionalnimi metodami temelji na kombinaciji makroskopskih (oblika, površina in barva kolonij, reverz) in mikroskopskih lastnosti gliv. Na podlagi makroskopskih značilnosti glive ter dobrega mikroskopskega preparata (dobro vidne hife, razmnoževalne strukture) lahko identificiramo glive tudi do vrste. Ker pa gre za »vizualno« metodo je uspešnost le-te odvisna od rasti in sporulacije glive. V primeru slabe sporulacije uporabljamo posebna gojišča (npr. koruzni agar, ovseni agar, Czapkov agar), ki so manj bogata s hranili in posledično inducirajo sporulacijo (Brandt in sod., 2011). Identifikacija najpogostejšega povzročitelja mikoze med plesnimi do rodu *Aspergillus* ni zahtevna in temelji predvsem na opazovanju morfoloških lastnosti, ki so značilne za ta rod. Težavno pa je razlikovanje vrst znotraj rodu *Aspergillus*, še posebej kadar je sporulacija počasna. Razlikovanje med vrstami gliv rodu *Aspergillus* pa je zaradi razlik v patogenosti in zdravljenju izrednega pomena (Patterson, 2011). Kadar s konvencionalnimi metodami ne moremo identificirati povzročitelja mikoze ali pa je identifikacija vprašljiva, si lahko pomagamo z molekularnimi metodami.

### 2.7.2 Molekularne metode

Molekularne metode so postale popularne predvsem zaradi enostavne uporabe, kratkega časa, ki je potreben za izvedbo metode, predvsem pa zaradi objektivnosti. So veliko bolj občutljive ter specifične kot konvencionalne metode. Pri molekularnih testih je kultivacija predpogoj, saj je občutljivost manjša kot pri bakterioloških in viruloških PCR metodah. Kljub temu pa rezultate dobimo prej kot pri konvencionalnih metodah. Identifikacija ni odvisna od rasti glive ter tvorbe značilnih razmnoževalnih oziroma prepoznavnih struktur. Zaradi tega razloga so omenjene metode uporabne pri glivah, ki rastejo ali sporulirajo



počasneje oziroma so manj morfološko značilne. Molekularne metode so torej točne, hitre ter objektivne in tako primerne za taksonomijo in nomenklaturu. Ena izmed slabosti te metode je nenehno spreminjanje taksonomije, saj se v medicini lahko uporabljajo tudi druga imena gliv. Zaradi nenehnega spreminjanja taksonomije gliv se lahko zgodi, da zdravniki oziroma zdravstveni delavci niso seznanjeni z novejšim poimenovanjem. Velika omejitev molekularnih metod je, da zaenkrat še niso popolnoma standardizirane in so precej dražje od konvencionalnih metod (Larone, 2011).

Večina klasičnih molekularnih metod zajema naslednje osnovne korake: ekstrakcijo DNA, pomnoževanje le-te, običajno z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) ter določitev in analizo pomnoženih zaporedij DNA (Larone, 2011). Verižna reakcija s polimerazo je najpogostejši način pomnoževanja nukleinskih kislin (Sodja in sod., 2009).

Komercialni sistemi in novejša razvite molekularne tehnike so Accu Probe test, PNA-FISH, Luminex xMAP.

- **PNA FISH:** *In situ* fluorescentna hibridizacija s peptidonukleotidnimi sondami (angl.: *Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization*), ki je uporabna večinoma za kvasovke. Princip metode temelji na označevanju željenih delov kromosomov s fluorescentnimi sondami, ki jih nato opazujemo pod fluorescentnim mikroskopom. Fluorescentne sonde PNA se s hibridizacijo vežejo na rRNA, Opazovanje teh kompleksov nam omogoča določanje organizma. Metoda je občutljiva in relativno hitra, vendar pa lahko prepoznamo le določene skupine kvasovk in ne posameznih vrst (Larone, 2011).
- **Accu Probe test:** Ta komercialni test je na voljo za identifikacijo tako bakterij (tudi mikobakterij) kot gliv in je običajno 100 % občutljiv in specifičen. Test temelji na hibridizaciji enoverižnih DNA sond in rRNA. Glivni izolat najprej liziramo s sonifikacijo nato pa termično obdelamo pri 95 °C za 10 minut. Posledično se iz liziranih celic sprosti rRNA, ki je izpostavljena DNA sondam in tako poteče DNA-RNA hibridizacija pri 60 °C. Sonde so kemiluminiscenčno označene z akridinijevim estrom. Če je prisotna tarčna rRNA, se veže na DNA sondo, ki je označena z akridinijevim estrom. S pomočjo luminometra merimo emisijo svetlobe, ki nastane ob reakciji dobljenih kompleksov in NaOH. Končni rezultati testa, ki jih dobimo so kvalitativni: pozitiven ali negativen rezultat testa (Larone, 2011).
- **Luminex xMAP:** Test temelji na pomnoževanju vzorca s PCR, temu sledi hibridizacija s sondo na polistirenske kroglice, ki so različno obarvane. Po hibridizaciji se z biotinom označeni produkti PCR vežejo s streptavidinom, ki je označen s fikoeritrinom (fluorofor). Sledi zaznavanje značilnih produktov PCR na podlagi fluorescence fikoeritrina. Metoda je hitra in natančna, analiziramo lahko 1000 in več vzorcev dnevno (Poljak in Kocjan, 2010).

Vsi ti komercialno dostopni testi za zdaj zelo dobro delujejo le na kvasovkah.

### 2.7.3 Masna spektrometrija

Masno spektrometrijo (MS) so leta 1975 prvič uporabili za karakterizacijo bakterij na osnovi proteoma. Pri tem so znanstveniki ugotovili, da kot rezultat dobijo različne spektre, ki ustrezajo različnim vrstam in rodovom pripravljenih ekstraktov bakterij (Anhalt in Fenslau, 1975). V letih 1980 so se začele razvijati tehnike hitro atomsko bombardiranje (angl. *Fast atom bombardment*), plazemska desorpcija (angl. PD-Plasma desorption) ter laserska desorpcija (angl. *Laser desorption*), ki so že vodile k tipizaciji bakterij (Croxatto in sod., 2011). Na začetku so lahko analizirali le molekule z veliko molekulsko maso (na primer. bakterijski lipidi). Nato je sledil razvoj milejših ionizacijskih tehnik (angl. *soft ionization*) kot sta na primer MALDI-TOF MS ter ESI (angl. *Electrospray ionization*). Ta tehnika ionizacije je omogočila MS analizo velikih biomolekul kot so na primer intaktne beljakovine (De Carolis in sod., 2014). Holland in sod. (1996) so pridobili prve spektre bakterijskih vzorcev, ki so jih identificirali brez ekstrakcije beljakovin. Dandanes pa se MALDI-TOF MS vedno bolj uporablja v mikrobioloških laboratorijih in je tarča številnih študij in raziskav.

#### 2.7.3.1 Princip MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS je tehnika masne spektrometrije, ki omogoča ionizacijo oziroma uparjanje velikih, nehlapnih molekul, kot so intaktne beljakovine (De Carolis in sod., 2014). Molekule, ki jih detektira, so beljakovine, glikopeptidi, oligonukleotidi ter ogljikovi hidrati (Lavigne in sod., 2013). Spektre običajno sestavljajo visoko ohranjene beljakovine (strukturne beljakovine, na DNA ali RNA vezavne beljakovine, translacijski začetni (iniciacijski) faktorji, stresne beljakovine,...). Ti biomarkerji ustvarijo spektralni prstni odtis, ki se med organizmi razlikuje ter ima specifične vrhove za rod, vrsto in podvrsto (De Carolis in sod., 2014).

Danes so v uporabi naslednji komercialni sistemi: MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Bremen, Nemčija), AXIMA@SARAMIS database (AnagnosTec, Potsdam, Nemčija in Shimadzu, Duisburg, Nemčija), VITEK MS systems (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francija) ter Andromas (Andromas, Pariz, Francija).



**Slika 8:** MALDI-TOF MS Biotyper proizvajalca Bruker Daltonik (Bremen, Nemčija) (foto: Zoran T.).

V bakteriologiji so ti sistemi dobro uveljavljeni, v mikologiji pa je to še vedno področje obširnega raziskovanja (Bader, 2013). Slika 8 prikazuje aparat MALDI-TOF MS, ki smo ga uporabili v študiji.

MALDI-TOF MS je sestavljen iz treh delov:

- ionizator (MALDI),
- masni analizator (TOF),
- detektor (Križaj, 2008).

Ionizator v obliki laserja omogoča tvorbo ionov (ionizacijo vzorca) ter pretvorbo iz trdnega oziroma tekočega v plinasto agregatno stanje. Masni analizator loči ione glede na razmerje mase in naboja ( $m/z$ ), detektor pa zazna ločene ione ter določi njihovo maso in naboj (De Carolis in sod., 2014).

MALDI-TOF MS temelji na principu kristalizacije matriksa in vzorca. Matriks je pomemben, ker absorbira energijo laserja in tako omogoča ionizacijo vzorca ter prehod le

tega v plinasto stanje (Lavigne in sod., 2013). Obstajajo različni matriksi, ki se razlikujejo po sestavi. Izbira le-teh je odvisna od vzorca, ki ga želimo analizirati, in je izredno pomembna, saj je od matriksa odvisna velikost in intenziteta pikov detektiranih molekul (Croxatto in sod., 2012).

Vzorec z matriksom obseva laser, čigar valovna dolžina je v absorpcijskem območju uporabljenega matriksa. Posledično pride do ionizacije vzorca ter pretvorbe v plinasto agregatno stanje. Ustvarjeni ioni se pospešeno gibljejo po elektrostatičnem polju proti cevi z vakuumom, kjer se nato ločijo glede na njihovo hitrost. Ta je odvisna predvsem od njihovega razmerja mase ( $m$ ) in naboja ( $z$ ). Ioni, ki so manjši oziroma imajo manjše razmerje  $m/z$ , potujejo hitreje, ioni z večjim razmerjem pa obratno. Tako vzorec sestavljajo molekule z različnim  $m/z$  razmerjem, ki so ločene z analizatorjem TOF. Masni spekter, ki ga dobimo, pa je označen z  $m/z$  in intenziteto ionov (število ionov z določenim  $m/z$  razmerjem, ki pride do detektorja) (Lavigne in sod., 2013).

Dobljen rezultat je masni spekter in predstavlja »podpis« določenega mikroorganizma. Dobljeni masni spektri se primerjajo z referenčnimi spektri iz podatkovne knjižnice. Po primerjavi dobimo tudi numerično vrednost, ki omogoča hitro identifikacijo mikroorganizmov na nivoju rodu oziroma vrste. Vrednosti, ki so ustrezne za identifikacijo mikroorganizma na nivoju vrste, se razlikujejo od proizvajalca do proizvajalca. Za Bruker velja, da mora biti ta vrednost višja od 2,0, za VITEK MS pa višja kot 90 % (De Carolis in sod., 2014).

MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Bremen, Nemčija) predlaga za interpretacijo identifikacije naslednje vrednosti:

- 2,300...3,000 – veljavna identifikacija do nivoja vrste
- 2,000...2,299 – zanesljiva identifikacija do nivoja rodu
- 1,700...1,999 – verjetna identifikacija do nivoja rodu
- 0,000...1,699 – identifikacija ni zanesljiva

Pri identifikaciji večine bakterij so dobljene vrednosti zelo visoke (nad 2,000). Pri identifikaciji plesni pa za zdaj še ni tako dobrih rezultatov.

### 2.7.3.2 Obdelava vzorcev ter interpretacija rezultatov

Za identifikacijo lahko uporabimo cele mikroorganizme ali pa očiščene beljakovine. Identifikacija večine vegetativnih bakterij lahko poteka brez ekstrakcije vzorca, medtem ko je za odpornejše oziroma kompleksnejše bakterije, viruse ter glive nujna (Croxatto in sod., 2012). Najprimernejša priprava vzorca za identifikacijo je tista, ki jo je uporabil proizvajalec za ustvarjanje knjižnice. Proizvajalec Bruker priporoča pred identifikacijo polno ekstrakcijo z mravljično kislino, SARAMIS in VITEK-MS pa direktni nanos z lizo

na ploščici (angl. *on-target-lysis*). Osnovni princip nanašanja intaktnih mikroorganizmov na MALDI ploščico je precej enostavnejši od ekstrakcije. Intaktne mikroorganizme direktno nanese na jekleno ploščico in dodamo matriks, ki lizira celice (Bader, 2013). Za plesni je potrebna polna ekstrakcija, ki zaenkrat še ni tako zanesljiva in uspešna kot pri bakterijah. Tudi za kvasovke je potrebna ekstrakcija, vendar pa je uspešnost le-te veliko boljša kot pri plesnih (Croxatto in sod., 2012).

Ekstrakcija vzorcev plesni se začne z inokulacijo kulture v tekoče gojišče ter inkubacijo pri sobni temperaturi. Po 24-48 urni inkubaciji sledi spiranje vzorca z vodo, da odstranimo čimveč gojišča. Nato sledi dodatek etanola, ki omogoča ekstrakcijo vzorca ter čiščenje nečistoč. Po sušenju vzorcev sledi dodatek mravljične kisline in acetonitrila. Vzorce nato nanese na jekleno ploščico za MALDI-TOF MS. Na vzorec nanese matriks, ki ga sestavljajo majhne, kisle molekule, ki imajo močno optično absorpcijo v območju valovne dolžine laserja. Vzorec z matriksom nato vstavimo v napravo, kjer se vzpostavi vakuum in ga obseva laserski žarek (240 pulzov) valovne dolžine 337 nm (Croxatto in sod., 2012).

Rezultat, ki ga dobimo, je torej masni spekter, ki se primerja z referenčnimi spektri iz knjižnice. MALDI-TOF MS nemškega proizvajalca Bruker uporablja programsko opremo MALDI BioTyper. Ta vključuje tudi določene bioinformacije ter knjižnico s približno 2000 vrstami oziroma 3000 spektri. V knjižnico so vključene tako bakterije kot tudi glive in mikobakterije (Lavigne in sod., 2013).

### 2.7.3.3 Prednosti in slabosti MALDI-TOF MS

Največja prednost metode MALDI-TOF MS je enostavna uporaba, objektivnost, predvsem pa čas in denar, ki sta vložena za identifikacijo vzorca (Croxatto in sod., 2011). Identifikacija poteka na ploščici s 96 mesti, kar pomeni, da lahko naenkrat identificiramo več vzorcev (Lavigne in sod., 2013). Največja slabost so pomanjkljive knjižnice. Ostale prednosti in slabosti metode MALDI-TOF MS so podane v preglednici 1.

**Preglednica 1: Prednosti in slabosti konvencionalnih metod ter MALDI-TOF MS (Brandt in sod., 2011; Larone, 2011).**

	<b>Konvencionalne metode</b>	<b>MALDI-TOF MS</b>
<b>Prednosti</b>	<p>Cenovno ugodne</p> <p>Dobro poznane in standardizirane</p> <p>Primerne za kvasovke in plesni</p>	<p>Hitra in objektivna metoda</p> <p>Natančna, specifična in občutljiva metoda</p> <p>Primerna za morfološko zahtevnejše vrste</p> <p>Avtomatizirana metoda</p> <p>Analiza več vzorcev hkrati</p> <p>Enostavno rokovanje z napravo</p>
<b>Slabosti</b>	<p>Potreben je izkušen mikolog</p> <p>Subjektivno odčitovanje rezultatov</p> <p>Dolgotrajni postopki ter dolgi časi inkubacije</p> <p>Težavno ločevanje znotraj sekcij</p>	<p>Ekstrakcija še ni standardizirana</p> <p>Na analizo vpliva starost kulture ter čas inkubacije</p> <p>Identifikacija je omejena na proizvajalčevo knjižnico</p> <p>Dolgotrajni ekstrakcijski postopki</p> <p>Včasih potrebne ponovne analize</p> <p>Identifikacija plesni je manj uspešna</p> <p>Lahko pride do razlikovanja sorodnih mikroorganizmov</p> <p>Metoda v veliki meri odvisna od uspešnosti ekstrakcije</p>

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci

V raziskavi smo uporabili klinične in okoljske izolate različnih vrst plesni. Večino kliničnih vzorcev smo izolirali v obdobju 2014-2015, na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij. Nekaj kultur, predvsem gliv iz reda Mucorales, smo pridobili iz Mikrobiološke zbirke ekstremofilnih mikroorganizmov Ex, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (MRIC-UL Mycosmo) iz Oddelka za biologijo, ter iz zbirke gliv Centraalbureau voor Schimmelcultures - Fungal Biodiversity Centre (CBS, Utrecht, Nizozemska). V naši zbirki gliv so prevladovali glive rodu: *Fusarium*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* ter *Penicillium*.

**Preglednica 2: Seznam vseh uporabljenih rodov plesni.**

Rod plesni	Število izolatov
<i>Aspergillus</i>	15
<i>Cladosporium</i>	3
<i>Cunninghamella</i>	4
<i>Fusarium</i>	15
<i>Lichtheimia</i>	9
<i>Microsporum</i>	1
<i>Mucor</i>	12
<i>Paecilomyces</i>	1
<i>Neosartorya</i>	1
<i>Penicillium</i>	26
<i>Rhizopus</i>	5
<i>Rhizomucor</i>	3
<i>Syncephalastrum</i>	1

Kulture smo shranili na stalna gojišča ter jih do nadaljnje obdelave zamrznili na -20 °C. Vse kulture smo pred identifikacijo z MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik, Bremen, Nemčija) gojili na Sabouraud-ovem agarju 24–48 ur in jih identificirali na podlagi morfoloških lastnosti kolonij in nespolnih razmnoževalnih struktur. Sevi, ki smo jih pridobili iz Biotehniške fakultete zbirke Ex ter glivne zbirke v Utrechtu pa so bili predhodno identificirani na podlagi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA ter dela gena, ki kodira  $\beta$ -tubulina ali vmesnega distančnika (ITS).

Preglednica 3: Seznam vseh uporabljenih plesni, ki smo jih uporabili v študiji.

<b>Plesen</b>	<b>Število izolatov</b>	<b>Sev</b>
<i>Absidia sp.</i>	2	EXF-123, EXF-4694
<i>Absidia glauca</i>	1	EXF-305
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	O-G1-1 *
<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	1	CBS 132254
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6	EXF-5898, 5250, 4684, 5457, 5483-1, 4970-1
<i>Aspergillus lentulus</i>	1	CBS 117885
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	12465-1
<i>Aspergillus niger</i>	4	4297, 3596-1, 3193-1, 6510
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1	2648
<i>Cladosporium sp.</i>	1	5129-2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	EXF-1071, EXF-381
<i>Cunninghamella sp.</i>	3	6854, EXF-7131, EXF-1923
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	1	N-G1-6
<i>Fusarium sp.</i>	2	5272, 13564-1
<i>Fusarium dimerum</i>	2	EXF-7922, EXF-7060
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	15351, 10000-1, 9704 EXF-6324, EXF-5559
<i>Fusarium proliferatum</i>	2	9887, EXF-9394
<i>Fusarium solani</i>	3	5236-2, EFX-5554, EXF-8483
<i>Fusarium verticillioides</i>	1	CBS 116665
<i>Lichtheimia coerulea</i>	1	CBS 628.70B
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	5	14676-1, 12702, N-G1-40, 6477, CBS 120805
<i>Microsporum canis</i>	1	12260-1
<i>Mucor sp.</i>	1	12925-1
<i>Mucor amphibiorum</i>	1	EXF-4526
<i>Mucor circinelloides</i>	4	EXF-4532, EXF-9164, EXF-6296, EXF-8124, 12925-1
<i>Mucor hiemalis</i>	2	EXF-4548, EXF-4547
<i>Mucor indicus</i>	1	CBS 123974
<i>Mucor racemosus</i>	1	EXF-5556
<i>Mucor ramosissimus</i>	1	CBS 135.65
<i>Mucor velutinosus</i>	1	N-G1-11
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	CBS 13802
<i>Neosartorya pseudofischeri</i>	1	CBS 208.92
<i>Penicillium sp.</i>	15	O-G1, O-G2, O-G3, O-G4, O-G5, O-G6, O-G7, O-G8, O-G9, O-G10, O-G11, O-G1, O-G13, O-G14, O-G15 *
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	5219--1, EXF-5904, EXF-5906
<i>Penicillium corylophilum</i>	3	13727, EXF-3795, EXF-5893
<i>Penicillium crustosum</i>	1	EXF-3872
<i>Penicillium glabrum</i>	2	EXF-8017, EXF-8601
<i>Penicillium commune</i>	2	EXF-8119, EXF-8121
<i>Rhizopus microsporus</i>	1	CBS 111563
<i>Rhizopus arrhizus</i>	4	N-G1-67, 13032-1, 10738, EXF-4447
<i>Rhizomucor pusillus</i>	3	EXF-4528, EXF-4436, EXF-4434
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1	EXF-7435
<b>skupaj</b>	<b>96</b>	



EXF kratice predstavljajo oznake glivnih sevov v Mikrobiološki zbirki ekstremofilnih mikroorganizmov Ex. CBS kratice označujejo izolate glivnih sevov iz zbirke gliv Centraalbureau voor Schimmelcultures - Fungal Biodiversity Centre. Sevi, ki smo jih izolirali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij imajo številčno oznako ter oznake N-G1. Plesni označene s \* smo pridobili z vzorčenjem zraka in imajo oznako O-G.

### 3.1.2 Gojišča

Vsa gojišča, ki smo jih uporabili pri raziskavi, so pripravili v Službi za pripravo gojišč in reagentov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Vsa gojišča so sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min na 121 °C. Pripravili so jih po naslednjih recepturah:

a) Sabourad-ov agar z dodanim gentamicinom in kloramfenikolom-SABA (Larone, 2011):

- Neopepton 10 g
- Dekstroza 40 g
- Agar 19 g
- Destilirana voda 1000 mL
- Kloramfenikol (50 mg/mL) 1 mL (dodano po avtoklaviranju, po predhodni filtraciji preko filtra s porami premera 0,2 µm)
- gentamicin (40 mg/mL) 2,5 mL (dodano po avtoklaviranju, po predhodni filtraciji preko filtra s porami premera 0,2 µm)

pH: 5,6 (umerjeno z dodatkom 2-3 kapljic mlečne kisline).

b) Sabourad-ov bujon-SABB (Larone, 2011):

- Neopepton 10 g
- Dekstroza 20 g
- Destilirana voda 1000 mL

pH: 5,6 (umerjeno z dodatkom 2-3 kapljic mlečne kisline).

c) Tioglikolatni bujon-TIO (Atlas, 1995):

- Tioglikolatni bujon 29,8 g
- Hemin (5 mg/mL) 1 mL
- Vitamin K (1 mg/mL) 1 mL
- Destilirana voda 1000 mL

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Predpriprava sevov

Zamrznjene kulture Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, liofilizirane seve iz CBS zbirke gliv ter seve na poševnikih iz zbirke Ex Biotehniške fakultet smo najprej nacepili na poševnike SABA. Vzorce smo inkubirali na 30 °C, 3-5 dni (odvisno od hitrosti rasti posameznega seva). Po inkubaciji smo seve precepili na SABA ter ponovno inkubirali pri 30 °C, 3 dni. Po dvakratnem precepljanju kultur je sledila ekstrakcija beljakovin po treh različnih metodah.

#### 3.2.1.1 Oživljanje kultur plesni

Kulture, ki smo jih pridobili iz CBS zbirke gliv, so bile liofilizirane. Seve smo oživili po priloženih navodilih iz CBS. Po prečnočni inkubaciji smo suspenzijo nacepili na SABA in TIO ter vsa gojišča inkubirali pri 30 °C. Dolžina inkubacije je bila odvisna od posameznega seva, od 5 do 21 dni.

#### 3.2.1.2 Gojenje plesni

Vse kulture glive smo gojili na SABA ter inkubirali pri 30 °C. V primeru, da je bila rast zelo počasna, smo kulturo inokulirali v obogatitveno gojišče TIO. Pred izvedbo polne ekstrakcije po Brukerju smo kulture 24 ur stresali v gojišču SABB pri sobni temperaturi.

### 3.2.2 Priprava matriksa

Pri naši študiji smo kot matriks uporabili raztopino iz  $\alpha$ -ciano-4-hidroksicinaminske kisline (HCCA), 50 % acetonitrila ter 2,5 % trifluoroocetne kisline (Služba za pripravo gojišč in reagentov, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija).

Standardno raztopino matriksa smo pripravili po naslednjem protokolu: V mikrocentrifugirki smo zmešali 475  $\mu$ L sterilne vode in 25  $\mu$ L 100-odstotnega trifluoroacetata (TFA) ter 500  $\mu$ L acetonitrila. Standardno raztopino smo premešali z vibracijskim mešalnikom in 250  $\mu$ L odpipetirali v mikrocentrifugirko z matriksom. Nato

smo mešali z vibracijskim mešalnikom pri sobni temperaturi nekaj minut, da se HCCA popolnoma raztopi. Končna koncentracija matriksa je bila 10 mg HCCA/mL. Matriks smo shranili pri sobni temperaturi zavitega v aluminijasto folijo.

### 3.2.2.1 Priprava bakterijskega standarda (BST)

V mikrocentrifugirko s standardom BST (ekstrakt *E.coli* DH5alpha; Bruker Daltonik, Bremen, Nemčija) smo prenesli 50 µL standardne raztopine, ki smo jo uporabili tudi za pripravo matriksa. BST s standardom smo premešali s pipetiranjem (20x) in inkubirali pri sobni temperaturi. Po 5-minutni inkubaciji smo raztopino ponovno premešali s pipetiranjem (20x). V primeru, da je bila raztopina motna, smo centrifugirali 2 minuti na 11337 x g. Pripravljeni BST smo hranili pri -18 °C.

### 3.2.3 Metoda polne ekstrakcije

Metoda ekstrakcije, ki jo priporoča proizvajalec, nam je služila kot referenčna metoda in smo jo izvedli po navodilih proizvajalca aparature MALDI-TOF MS, to je Bruker Daltonik. Vzorce smo najprej inokulirali v tekoče gojišče SABB ter stresali pri sobni temperaturi 24-48 ur (odvisno od hitrosti rasti gliv). Stresanje med inkubacijo je pomembno, saj s tem preprečimo sporulacijo gliv.



**Slika 9:** Stresalnik oziroma rotator za epruvete z navojem (foto: Zoran T.).

Po 24-urni inkubaciji na rotorju (slika 9) smo vzorce postavili na pult in počakali, da se je vsebina usedla oziroma smo vzorce na hitro centrifugirali pri nizkih obratih. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali največ 1,5 mL sedimenta. Nato smo centrifugirali 2

minuti pri maksimalni hitrosti (12045 x g). Po odstranitvi supernatanta smo k peletu dodali 1 mL destilirane vode ter nekaj sekund mešali z vibracijskim mešalnikom, toliko, da se je razbil pelet. Sledilo je centrifugiranje 2 minuti pri maksimalni hitrosti. Ko smo odstranili supernatant smo dodali 1 mL destilirane vode ter premešali z vibracijskim mešalnikom. Po 2-minutnem centrifugiranju pri maksimalni hitrosti, smo odstranili supernatant. K peletu smo dodali 300 µL destilirane vode ter 900 µL absolutnega etanola (Etanol brezvodni, KEFO, Ljubljana, Slovenija). Vzorce smo premešali z vibracijskim mešalnikom ter centrifugirali 2 minuti pri maksimalni hitrosti. Po odstranitvi supernatanta smo vzorce ponovno centrifugirali pri maksimalni hitrosti nekaj sekund, da smo odstranili preostanek etanola. Sledilo je sušenje peleta pri 37 °C, ki je trajalo približno 20-30 minut (odvisno od velikosti peleta). K suhemu peletu smo nato dodali 70 % mravljično kislino. Količina dodane mravljične kisline je bila odvisna od velikosti peleta, ki ga je morala popolnoma prekriti. Manjšim peletom smo dodali 10-20 µL ter večjim tudi do 100 µL mravljične kisline. Vzorce smo vorteksirali in nato dodali isto količino acetonitrila (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija). Previdno smo premešali ter centrifugirali 2 minuti pri maksimalni hitrosti. V novo mikrocentrifugirko smo prenesli 20 µL ekstrahirane vzorca ter shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

### 3.2.4 Neposredni nanos

Vzorce smo obdelali kot je opisano v študiji De Carolis s sodelavci (2011). Ti so v svoji študiji, ki je temeljila na glivah rodu *Aspergillus*, *Fusarium*, Mucorales, vzorce obdelali z destilirano vodo in etanolom.

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 200 µL destilirane vode. S sterilno cepilno zanko smo pridobili kolonijo in jo resuspendirali v mikrocentrifugirki z destilirano vodo. Na ploščico za analizo MALDI-TOF MS smo nanесли 1 µL suspenzije in počakali, da se posuši. Nato smo dodali 1 µL absolutnega etanola ter počakali, da se posuši. Ko je bila ploščica z vzorci suha, smo nanесли 1 µL matriksa ter ploščico s posušenimi vzorci identificirali z MALDI-TOF MS.

### 3.2.5 Delna ekstrakcija

Vzorce smo obdelali kot je opisano v študiji Cassagne s sodelavci (2011). Cassagne in sodelavci (2011) so v svoji raziskavi izvedli delno ekstrakcijo z etanolom, mravljično kislino in acetonitrilom.

V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 300 µL destilirane vode ter 900 µL absolutnega etanola. Nato smo prenesli površino kolonije s sterilno cepilno zanko v mikrocentrifugirko in mešali z vibracijskim mešalnikom, toliko, da se je material resuspendiral. Vzorce smo centrifugirali 10 minut na 12045 x g. Po odstranitvi supernatanta, smo dodali 10 µL 70 % mravljične kisline. Po končani 5-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo dodali 10 µL

acetonitrila. Vzorce smo po 10- minutni inkubaciji pri sobni temperaturi centrifugirali (2 minuti, 12045 x g). Tako pripravljene vzorce smo prenesli (20 µL) v novo mikrocentrifugirko ter shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

### 3.2.6 Analiza vzorcev ter interpretacija rezultatov

Na ploščico smo nanesti 1,6 µL ekstrahiranega vzorca (supernatant). Vsak vzorec smo na ploščico nanesti na 2 mesti. Ko se je vzorec posušil, smo dodali 1,6 µL matriksa ter ploščico posušili na sobni temperaturi. Suho ploščico smo vstavili v masni spektrometer ter s pomočjo računalniškega programa zagnali MALDI-TOF MS. Po končani analizi, smo na računalniku pridobili spektre ter rezultate identifikacije naših izolatov.

Za interpretacijo rezultatov smo uporabljali programsko opremo Biotyper RTC (Bruker Daltonik, Bremen, Nemčija).

Rezultati, ki jih pridobimo v obliki »log score«, so vrednosti od 0,000 do 3,000, s pomočjo katerih lahko napovedujemo zanesljivost identifikacije. Veljavna identifikacija do nivoja vrste je »log score« od 2,000 do 3,000. Zanesljiva identifikacija do nivoja rodu je v intervalu 1,700 do 1,999. Nezanestljiva identifikacija pomenijo vrednosti od 0,000 do 1,699. To pomeni, da ni nobenega ujemanja med preiskovanimi in referenčnimi sevi, ki so v knjižnici (Ghosh in sod., 2014).

### 3.2.7 Izdelava knjižnice

Ker je izdelava nove knjižnice za MALDI-TOF MS zelo zahtevna in časovno obsežna, smo za našo študijo uporabili le en sev: *Aspergillus lentulus* (CBS 117885). Priprava knjižnice oziroma vnos novega seva *Aspergillus* v že obstoječo knjižnico je potekal po navodilih proizvajalca Bruker Daltonik, Nemčija (Bruker...2015).

Za izdelavo knjižnice so potrebni dobri spektri, zato je nujna uporaba svežih kemikalij. Najprej smo pripravili svež matriks ter BTS standard po prej omenjenem postopku, ki je opisan na prejšnjih straneh. Sledila je polna ekstrakcija izolata *Aspergillus lentulus* CBS 117885 po navodilih proizvajalca Bruker Daltonik. Po ekstrakciji smo na sredino ploščice nanesti BTS standard ter vzorec *A. lentulus*. Sledil je nanos matriksa ter pridobivanje spektrov z MALDI-TOF MS. Pri slednjem je prvi korak kalibracija BTS standarda. Nato smo pridobili za vsak izolat vsaj 20 posnetkov kakovostnih masnih spektrov, ki so bili primerni za nadaljnjo obdelavo. Ko smo pridobili potrebne spektre, je sledila obdelava le-teh v programu FlexAnalysis in Biotyper OC-MSP creation. Na koncu smo obdelane spektre vnesli v že obstoječo knjižnico ter preverili, ali je naš vnos uspel tako, da smo z MALDI-TOF MS analizirali 3 vzorce: *A. lentulus* (CBS 117885) ter 2 vzorca *A. fumigatus* (5250 in 4907-1).

### 3.2.8 Statistična obdelava rezultatov

Rezultate smo obdelali s pomočjo statističnega progama R, verzija 2.12.0 (Hornik, 2015), in sicer z uporabo Pearsonove hi-kvadrat statistike. Postavljena ničelna hipoteza je bila, da med testiranimi metodami ni razlik.

Dobljeno hi-kvadrat vrednost smo primerjali s tabelarično vrednostjo  $-3,841$ , ki smo jo odčitali iz preglednice za hi-kvadrat statistiko. Če je dobljena hi-kvadrat vrednost večja od tabelarične pomeni, da ni statistično pomembna in ničelno hipotezo obdržimo. Tako lahko s 95 % zanesljivostjo trdimo, da med primerjanimi metodami ni statistično značilnih razlik. V primeru, da je bila dobljena vrednost hi-kvadrat manjša od tabelarične vrednosti, smo ničelno hipotezo zavrnili. Vrednost hi-kvadrat torej ni statistično pomembna in s 95 % zanesljivostjo lahko trdimo, da so med primerjanimi metodami statistično značilne razlike.

## 4 REZULTATI

V naši raziskavi smo uporabili 96 identificiranih izolatov, iz dveh priznanih mikrobioloških zbirk, ki smo jih obdelali pred analizo MALDI-TOF MS s tremi različnimi ekstrakcijskimi metodami:

1. Metoda polne ekstrakcije,
2. metoda delne ekstrakcije z mravljično kislino,
3. neobdelane celice izolatov, neposredno nanešene na ploščico.

### 4.1 REZULTATI IDENTIFIKACIJE IZOLATOV PLESNI, KI SO PRIPADALI VRSTAM, VKLJUČENIM V PODATKOVNO KNJIŽNICO

V naši raziskavi smo uporabili 73 izolatov plesni, ki so pripadali vrstam vključenim v proizvajalčevo podatkovno knjižnico. Od vseh uporabljenih vrst plesni, je bilo v podatkovno knjižnico vključenih 27 različnih vrst plesni.

#### 4.1.1 Primerjava metod polne in delne ekstrakcije beljakovin

Rezultati, ki prikazujejo uspešnost metod polne in delne ekstrakcije beljakovin plesni, so prikazani v preglednici 4. Vse vrednosti »log score«, ki so enake ali presegajo mejo 1,7, smo smatrali kot uspešno identifikacijo. Rezultati so prikazani za vrste plesni, ki so vključene v podatkovno knjižnico. V preglednici 4 je podano število uporabljenih izolatov, število uspešno identificiranih izolatov z metodo polne in delne ekstrakcije ter odstotek uspešno identificiranih izolatov za posamezno metodo ekstrakcije. Natančnejša preglednica, v kateri so prikazane vrednosti meritev posameznih izolatov analiziranih z metodo MALDI-TOF MS, je prikazana v prilogi A in B.

**Preglednica 4: Primerjava pravilno identificiranih plesni z metodo polne in delne ekstrakcije beljakovin.**

Plesen	Število izolatov	Število uspešno identificiranih izolatov pri polni ekstrakciji	Število uspešno identificiranih izolatov pri delni ekstrakciji
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	1	1
<i>A. fumigatus</i>	6	5	4
<i>A. nidulans</i>	1	1	0
<i>A. niger</i>	4	2	2
<i>A. parasiticus</i>	1	1	1
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0	0
<i>C. cladosporioides</i>	2	0	0
<i>Fusarium dimerum</i>	2	1	0
<i>F. oxysporum</i>	5	3	4
<i>F. proliferatum</i>	2	1	2
<i>F. solani</i>	3	2	2
<i>F. verticillioides</i>	1	0	1
<i>Lichtheimia coerulea</i>	1	1	1
<i>L. corymbifera</i>	5	4	1
<i>Microsporium canis</i>	1	0	0
<i>Mucor. circinelloides</i>	4	2	2
<i>M. ramosissimus</i>	1	0	0
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	1	1
<i>Penicillium sp.</i>	15	0	2
<i>P. chrysogenum</i>	3	1	0
<i>P. corylophilum</i>	3	1	0
<i>P. crustosum</i>	1	0	0
<i>P. glabrum</i>	2	0	0
<i>P. commune</i>	2	0	0
<i>Rhizopus microsporus</i>	1	0	0
<i>Rhizomucor pusillus</i>	3	0	0
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1	0	0
<b>Skupaj</b>	73	27	24
<b>Odstotek</b>	100	36,9	32,9

V naši študiji smo želeli preveriti uspešnost identifikacije 73-ih izolatov, ki so pripadali vrstam, vključenim v knjižnico. Iz preglednice 4 je razvidno, da smo z metodo polne ekstrakcije uspešno identificirali 27 izolatov (36,9 %), z metodo delne ekstrakcije pa 24 izolatov (32,9 %). Izračunana vrednost hi-kvadrat je 0,119 in je manjša od tabelarične vrednosti 3,841 (SP=1,  $\alpha=0,05$ ,  $p < \alpha$ ). P-vrednost je 0,730 in je tako večja od 0,05. Vrednost hi-hvadrat tako ni statistično pomembna in ničelno hipotezo neodvisnosti obdržimo. Pri identifikaciji plesni med primerjanima metodama polne in delne ekstrakcije beljakovin torej ni statistično značilnih razlik.



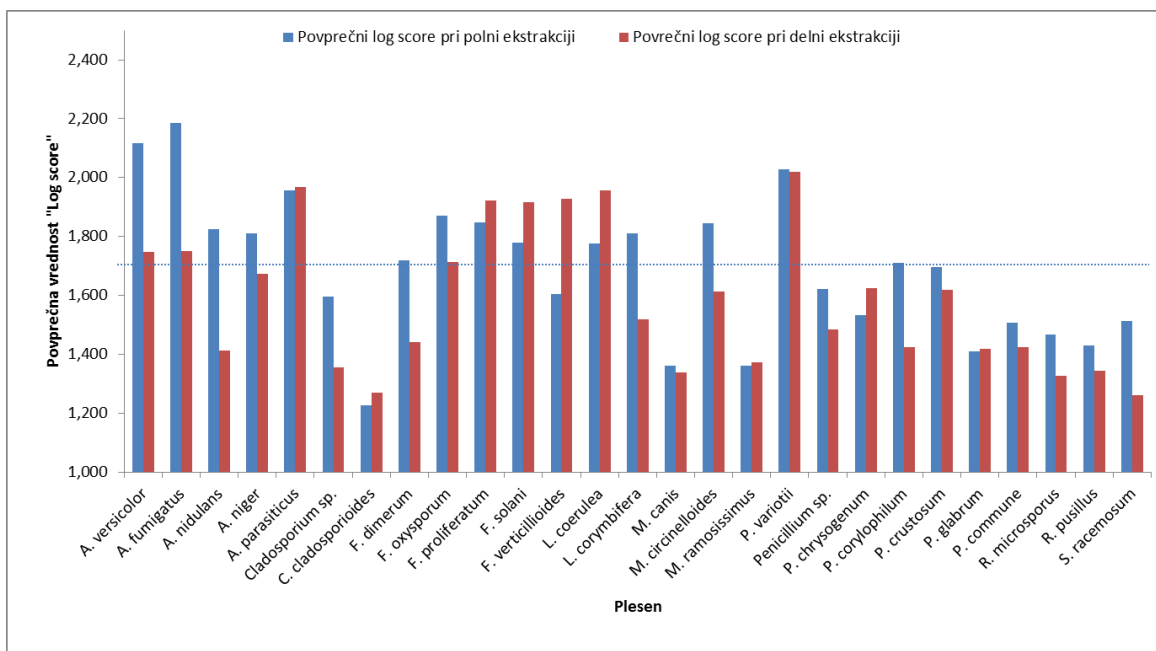
Z metodo polne ekstrakcije smo identificirali le 3 izolate več kot z metodo delne ekstrakcije. Opazimo lahko, da z nobeno od uporabljenih metod nismo dobili uspešne identifikacije plesni rodu *Rhizopus* (3 izolati), *Syncephalastrum* (1) ter *Cladosporium* (3). Z metodo polne ekstrakcije smo identificirali rodove: *Aspergillus* (13), *Fusarium* (13), *Lichtheimia* (6) in *Mucor* (5). Z delno ekstrakcijo pa smo dobili največ identificiranih izolatov rodu *Fusarium* (13) in *Aspergillus* (13). Zaradi relativno majhnega števila uporabljenih izolatov določenih vrst, ne moremo trditi, da je katera izmed uporabljenih metod pri določeni vrsti uspešnejša.

**Preglednica 5: Seznam izolatov s pripadajočimi povprečnimi vrednostmi »log score« pri metodi polne in delne ekstrakcije beljakovin.**

Plesen	Povprečje vrednosti "log score" pri polni ekstrakciji	Povprečje vrednosti "log score" pri delni ekstrakciji
<i>Aspergillus versicolor</i>	2,117	1,748
<i>A. fumigatus</i>	2,185	1,751
<i>A. nidulans</i>	1,826	1,412
<i>A. niger</i>	1,811	1,672
<i>A. parasiticus</i>	1,956	1,968
<i>Cladosporium sp.</i>	1,597	1,356
<i>C. cladosporioides</i>	1,227	1,270
<i>Fusarium dimerum</i>	1,718	1,441
<i>F. oxysporum</i>	1,870	1,712
<i>F. proliferatum</i>	1,849	1,921
<i>F. solani</i>	1,780	1,917
<i>F. verticillioides</i>	1,605	1,927
<i>Lichtheimia coerulea</i>	1,775	1,957
<i>L. corymbifera</i>	1,810	1,519
<i>Microsporum canis</i>	1,360	1,338
<i>Mucor circinelloides</i>	1,846	1,612
<i>M. ramosissimus</i>	1,361	1,371
<i>Paecilomyces variotii</i>	2,028	2,019
<i>Penicillium sp.</i>	1,621	1,483
<i>P. chrysogenum</i>	1,533	1,623
<i>P. corylophilum</i>	1,710	1,423
<i>P. crustosum</i>	1,695	1,618
<i>P. glabrum</i>	1,411	1,419
<i>P. commune</i>	1,507	1,423
<i>Rhizopus microsporus</i>	1,466	1,327
<i>Rhizomucor pusillus</i>	1,429	1,343
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1,512	1,261

V preglednici 5 so prikazana povprečja vrednosti »log score«, ki smo jih dobili pri identifikaciji izolatov z metodo polne in delne ekstrakcije beljakovin. V primeru večih

uporabljenih sevov, smo izračunali povprečje povprečij. Natančnejše vrednosti meritev za posamezne seve testiranih vrst so podane v prilogi A in prilogi B.



**Slika 10:** Prikaz povprečnih vrednosti »log score« pri identifikaciji plesni z metodo polne in delne ekstrakcije beljakovin plesni.

Tako iz preglednice 5, kot iz grafičnega prikaza (slika 10) je razvidno, da so povprečne vrednosti »log score« višje pri polni ekstrakciji. Na grafu je označena meja za veljavno identifikacijo do nivoja rodu, -1,7.

#### 4.1.2 Primerjava metode polne ekstrakcije beljakovin z neposrednim nanosom

Rezultati identifikacije plesni z metodo polne ekstrakcije beljakovin in neposrednim nanosom so v spodnji preglednici (preglednica 6). V preglednici je predstavljeno skupno število uporabljenih izolatov, število pravilno identificiranih izolatov in odstotek pravilno identificiranih plesni. Razvidno je, da je bila identifikacija uspešna pri 5 izolatih, kar pomeni da smo z metodo neposrednega nanosa uspešno identificirali 6,8 % vseh izolatov.

**Preglednica 6: Primerjava pravilno identificiranih plesni z metodo polne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa.**

Plesen	Število izolatov	Število uspešno identificiranih izolatov pri polni ekstrakciji	Število uspešno identificiranih izolatov pri neposrednem nanosu
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	1	1
<i>A. fumigatus</i>	6	5	2
<i>A. nidulans</i>	1	1	0
<i>A. niger</i>	4	2	0
<i>A. parasiticus</i>	1	1	0
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0	0
<i>C. cladosporioides</i>	2	0	0
<i>Fusarium dimerum</i>	2	1	0
<i>F. oxysporum</i>	5	3	0
<i>F. proliferatum</i>	2	1	0
<i>F. solani</i>	3	2	0
<i>F. verticillioides</i>	1	0	0
<i>Lichtheimia coerulea</i>	1	1	0
<i>L. corymbifera</i>	5	4	0
<i>Microsporium canis</i>	1	0	0
<i>Mucor circinelloides</i>	4	2	0
<i>M. ramosissimus</i>	1	0	0
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	1	0
<i>Penicillium sp.</i>	15	0	2
<i>P. chrysogenum</i>	3	1	0
<i>P. corylophilum</i>	3	1	0
<i>P. crustosum</i>	1	0	0
<i>P. glabrum</i>	2	0	0
<i>P. commune</i>	2	0	0
<i>Rhizopus microsporus</i>	1	0	0
<i>Rhizomucor pusillus</i>	3	0	0
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1	0	0
<b>Skupaj</b>	73	27	5
<b>Odstotek</b>	100	36,9	6,8

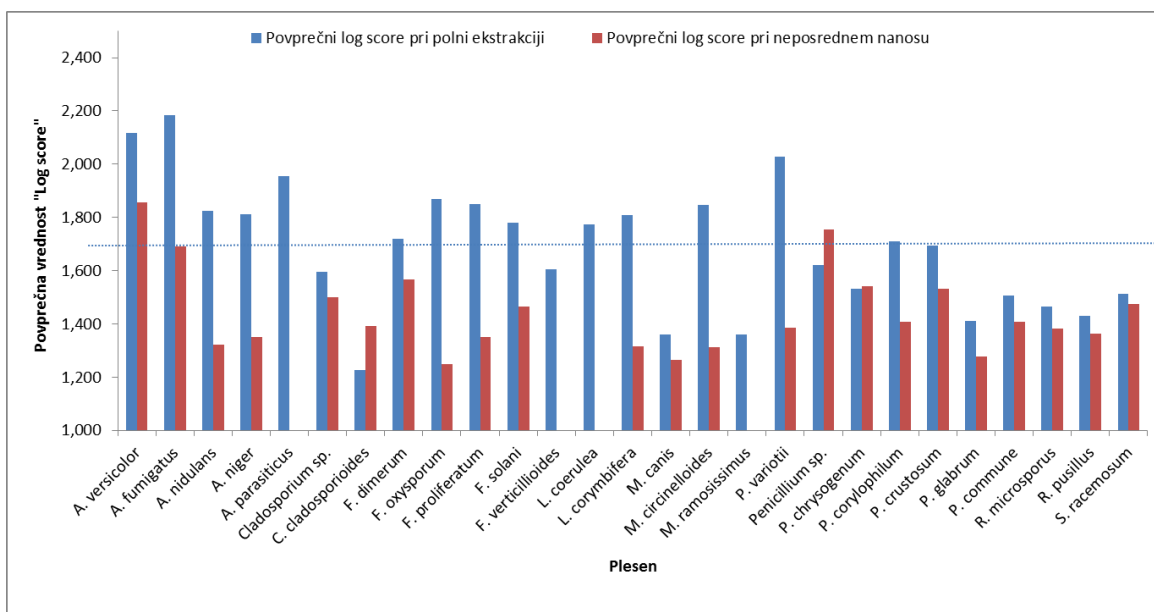
Dobljena vrednost hi-kvadrat je 17,519 in je večja od tabelarične vrednosti 3, 841. P-vrednosti, ki smo jo dobili znaša  $2,845 \cdot 10^{-5}$ . Posledično ničelno hipotezo zavrnamo. Tako lahko s 95 % zanesljivostjo trdimo, da so med primerjanima metodama statistično značilne razlike.

Spodnja preglednica (Preglednica 7) nam prikazuje povprečja vrednosti »log score«, pri metodi polne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa. Opazimo lahko, da smo pri metodi polne ekstrakcije dobili višje povprečne vrednosti »log score« kot pri metodi neposrednega nanosa.

**Preglednica 7: Seznam izolatov s pripadajočimi povprečnimi vrednostmi »log score« pri metodi polne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa.**

<b>Plesen</b>	<b>Povprečje vrednosti "log score" pri polni ekstrakciji</b>	<b>Povprečje vrednosti "log score" pri neposrednem nanosu</b>
<i>Aspergillus versicolor</i>	2,117	1,856
<i>A. fumigatus</i>	2,185	1,690
<i>A. nidulans</i>	1,826	1,321
<i>A. niger</i>	1,811	1,351
<i>A. parasiticus</i>	1,956	0,000
<i>Cladosporium sp.</i>	1,597	1,499
<i>C. cladosporioides</i>	1,227	1,392
<i>Fusarium dimerum</i>	1,718	1,566
<i>F. oxysporum</i>	1,870	1,250
<i>F. proliferatum</i>	1,849	1,349
<i>F. solani</i>	1,780	1,465
<i>F. verticillioides</i>	1,605	0,000
<i>Lichtheimia coerulea</i>	1,775	0,000
<i>L. corymbifera</i>	1,810	1,315
<i>Microsporum canis</i>	1,360	1,265
<i>Mucor circinelloides</i>	1,846	1,312
<i>M. ramosissimus</i>	1,361	0,000
<i>Paecilomyces variotii</i>	2,028	1,384
<i>Penicillium sp.</i>	1,621	1,754
<i>P. chrysogenum</i>	1,533	1,543
<i>P. corylophilum</i>	1,710	1,408
<i>P. crustosum</i>	1,695	1,532
<i>P. glabrum</i>	1,411	1,278
<i>P. commune</i>	1,507	1,408
<i>Rhizopus microsporus</i>	1,466	1,382
<i>Rhizomucor pusillus</i>	1,429	1,362
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1,512	1,475

Natančnejše vrednosti »log score« za posamezne seve testiranih vrst so podane v prilogi A ter prilogi B.



**Slika 11: Prikaz povprečnih vrednosti »log score« pri identifikaciji plesni z metodo polne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa.**

Iz grafičnega prikaza (slika 11), je razvidno, da je bila identifikacija pri metodi neposrednega nanosa uspešna pri naslednjih rodovih: *Aspergillus* (13 sevov) ter *Penicillium* (26 sevov). Črtna črta prikazuje mejo, ki določa uspešnost identifikacijo - 1,7.

#### 4.2 REZULTATI IDENTIFIKACIJE IZOLATOV PLESNI, KI SO PRIPADALE VRSTAM, KI NISO VKLJUČENE V PODATKOVNO KNJIŽNICO

S sistemom MALDI TOF MS smo poskušali identificirati 23 sevov plesni, ki so pripadali vrstam, ki niso vključene v podatkovno knjižnico (preglednica 8). Seznam rodov / vrst plesni, ki niso vključene v podatkovno knjižnico proizvajalca Bruker, je podan v preglednici 8.

**Preglednica 8: Seznam uporabljenih plesni, ki niso vključene v proizvajalčevo podatkovno knjižnico.**

Plesen	Število izolatov
<i>Absidia sp.</i>	2
<i>A. glauca</i>	1
<i>A. fumigatiaffinis</i>	1
<i>A. lentulus</i>	1
<i>Cunninghamella sp.</i>	3
<i>C. bertholletiae</i>	1
<i>Fusarium sp.</i>	2
<i>Mucor sp.</i>	1
<i>M. amphibiorum</i>	1
<i>M. hiemalis</i>	2
<i>M. indicus</i>	1
<i>M. racemosus</i>	1
<i>M. velutinosus</i>	1
<i>N. pseudofischeri</i>	1
<i>R. arrhizus</i>	4

Rezultati identifikacije plesni, ki niso vključene v podatkovno knjižnico, so skupaj s povprečjem vrednosti »log score« prikazani v preglednici 9.

**Preglednica 9: Primerjava povprečne vrednosti »log score« pri identifikaciji plesni z metodo polne in delne ekstrakcije beljakovin ter neposrednega nanosa.**

Plesen	Povprečje vrednosti "log score" pri polni ekstrakciji	Povprečje vrednosti "log score" pri delni ekstrakciji	Povprečje vrednosti "log score" pri neposrednem nanosu
<i>Absidia sp.</i>	1,621 ( <i>L. corymbifera</i> )	1,585	1,367
<i>A. glauca</i>	1,468	1,501	1,494
<i>A. fumigatiaffinis</i>	1,453	1,367	1,401
<i>A. lentulus</i>	1,529	1,434	1,375
<i>Cunninghamella sp.</i>	1,490	1,350	1,536
<i>C. bertholletiae</i>	1,378	1,328	0,000
<i>Fusarium sp.</i>	1,296	1,769	1,298
<i>Mucor sp.</i>	1,358	1,433	0,000
<i>M. amphibiorum</i>	1,264	1,214	0,000
<i>M. hiemalis</i>	1,540	1,450	0,000
<i>M. indicus</i>	1,439	1,297	0,000
<i>M. racemosus</i>	1,321	1,359	0,000
<i>M. velutinosus</i>	1,316	1,557	1,468
<i>N. pseudofischeri</i>	1,806 ( <i>A. fumigatus</i> )	1,972 ( <i>A. thermomutatus</i> )	1,678
<i>R. arrhizus</i>	1,471	1,584	1,483

Pri posameznih vrstah smo dobili identifikacijo plesni, te so prikazane v oklepajih.

Ugotovili smo, da ima 22 izolatov od 23-ih izolatov, ki pripadajo vrstam, ki niso vključene v knjižnico, pri vseh treh metodah povprečje vrednosti »log score« pod 1,7. Izjema je izolat *N. pseudofischeri*, pri katerem je vrednost »log score« nad 1,7 pri metodi polne in delne ekstrakcije.

#### 4.3 VNOS REFERENČNEGA MASNEGA SPEKTRA V PODATKOVNO KNJIŽNICO

V podatkovno knjižnico smo vnesli nov referenčni masni spekter izolata *Aspergillus lentulus* (CBS 117885). Rezultati identifikacije prej omenjenega izolata *A. lentulus* z nadgrajeno knjižnico so prikazani v preglednici 10, iz katere je razvidno, da je povprečna vrednost »log score« višja od 2,000.

**Preglednica 10: Povprečna vrednost »log score« pri metodi polne ekstrakcije beljakovin pri identifikaciji novo vnesenega izolata *Aspergillus lentulus* v podatkovno knjižnico.**

Plesen	Sev	Povprečje vrednosti "log score" pri polni ekstrakciji
<i>A. lentulus</i>	CBS 117885	2,473
<i>A. fumigatus</i>	5250, 4907-1	2,312

## 5 RAZPRAVA

Znanstveniki predvidevajo, da je na našem planetu do 5,1 milijonov vrst gliv (Blackwell, 2011). Po odkritju molekularnih orodij je prišlo na področju taksonomije gliv do nekaterih sprememb, ki so pomembne tudi za identifikacijo gliv v diagnostičnih laboratorijih. Tako se danes vrste dnevno dodajajo, ločujejo se kompleksi in preurejajo se taksonomske skupine. S tem pa je povezan tudi problem identifikacije gliv z masno spektrometrijo v diagnostičnih laboratorijih. Po revolucionarnem odkritju metode MALDI-TOF MS in uporabi le-te v bakterioloških laboratorijih so znanstveniki začeli raziskovati omenjeno metodo tudi v mikoloških laboratorijih (Cassagne in sod., 2011). Veliko raziskovalcev se osredotoča predvsem na specifične rodove ali sekcije, kot so: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Scedosporium*. Testirane ekstrakcijske metode so bile različno časovno obsežne. Tako so De Respini in sodelavci (2009) v svoji študiji z MALDI-TOF MS identificirali plesni rodu *Trichoderma*, kjer so za pripravo vzorcev uporabili 48-urno ekstrakcijsko metodo, medtem ko je ekstrakcija beljakovin v namen identifikacije plesni rodu *Penicillium* potekala kar 20 dni (Hettick in sod., 2008). Večina raziskovalcev stremi k temu, da bi našli ekstrakcijsko metodo, ki bo čim hitrejša, enostavna, dovolj občutljiva in specifična ter cenovno ugodna (Cassagne in sod., 2011). Zaradi pomanjkljivih komercialno dostopnih podatkovnih knjižnic ter zahtevne in zamudne priprave vzorcev, se MALDI-TOF MS za identifikacijo plesni v diagnostičnih laboratorijih zaenkrat še ne uporablja (Schulthess in sod., 2014).

V naši raziskavi smo želeli z masno spektroskopijo identificirati različne vrste plesni. Ker je ekstrakcija eden izmed ključnih dejavnikov za uspešno analizo z MALDI-TOF MS, smo testirali tri različne metode ekstrakcije proteoma plesni. Metodo polne ekstrakcije z mravljično kislino smo uporabili za standard, saj jo priporoča proizvajalec naprave MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik. Zaradi večkratnega spiranja z vodo in etanolom ter sušenjem peleta pred dodatkom mravljične kisline ter acetonitrila je metoda časovno potratna (45 min/vzorec). Druga metoda, ki smo jo testirali, je bila delna ekstrakcija z mravljično kislino. Ta metoda ekstrakcije predstavlja nekoliko skrajšano verzijo polne ekstrakcije, saj ne zajema spiranja z vodo in etanolom ter sušenja peleta. Pri zadnji metodi, ki smo jo preizkusili, gre za neposredni nanos suspendirane kulture plesni ter obdelavo z etanolom neposredno na ploščici. Namen naše raziskave je bil primerjati zgoraj omenjene metode ekstrakcije in tako preveriti ali je katera od testiranih metod primerna za rutinsko uporabo v laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij.

V drugem delu magistrske naloge smo želeli testirati specifičnost identifikacije z MALDI-TOF MS ter prikazati, kako pomembne so podatkovne knjižnice za uspešno identifikacijo. Izbrali smo izolat *A. lentulus*, ki ni vključen v proizvajalčevo podatkovno knjižnico in sami ustvarili vnos referenčnih masnih spektrov v že obstoječo knjižnico.



## 5.1 METODA POLNE EKSTRAKCIJE

Proizvajalec Bruker Daltonik za uspešno identifikacijo mikroorganizmov priporoča metodo polne ekstrakcije beljakovin, saj so s to metodo pridobili masne spektre proteoma referenčnih sevov v podatkovni knjižnici.

Od 73 izolatov, ki pripadajo vrstam vključenim v knjižnico, smo uspešno identificirali 27 izolatov (36,9 %). Zanesljivo identifikacijo smo dobili pri naslednjih rodovih: *Aspergillus* (10 od 13 sevov), *Fusarium* (7/13), *Lichtheimia* (5/6), *Mucor* (2/5), *Paecilomyces* (1/1) ter *Penicillium* (2/26). Pri identifikaciji zgoraj naštetih plesni so bile povprečne vrednosti »log score« nad 1,7. Identifikacija rodov *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum* ter *Cladosporium* je bila neuspešna, saj je bila povprečna vrednost dobljenih »log score« nižja od 1,7. Ker pa smo imeli majhno število izolatov, ne moremo trditi, da metoda polne ekstrakcije ni primerna za identifikacijo zgoraj omenjenih rodov.

Cassagne in sodelavci (2011) so v svoji študiji pokazali, da večkratno spiranje pri ekstrakciji močno vpliva na uspešnost identifikacije, saj je sama metoda na račun tega slabo ponovljiva. To je lahko dejavnik, zaradi katerega smo pri metodi polne ekstrakcije z mravljično kislino dobili manjšo uspešnost identifikacij, kot smo pričakovali.

Metoda polne ekstrakcije je za diagnostiko zamuden postopek, hkrati pa vsebuje veliko korakov, ki lahko vodijo v neuspešno identifikacijo. Eden izmed pomembnih kritičnih korakov je spiranje peleta z vodo in etanolom, pri čemer lahko odstranimo preveč peleta in tako zmanjšamo količino glivnega materiala. Ta korak je še posebej problematičen v primeru slabe rasti, saj je količina materiala, ki je na voljo za obdelavo majhna, in je potrebno previdno in smotrno ravnanje. Pomemben korak pri ekstrakciji je dodatek etanola in nato stresanje materiala na vibracijskem mešalniku. Pri tem je pomembno, da stresamo dovolj dolgo in nagibamo mikrocentrifugirko z materialom, da se pelet popolnoma razbije, saj ima tako etanol dostop do vsega materiala. Cilj ekstrakcije je namreč, da porušimo strukturo celične stene plesni in tako pridobimo beljakovine s čim manj nečistočami iz gojišča. Le-te kasneje lahko motijo identifikacijo z MALDI-TOF MS. Ključno za uspešno identifikacijo je tudi sušenje peleta ter dodajanje mravljične kisline in acetonitrila. Ker v našem laboratoriju nismo imeli na voljo vakuumske črpalke, ki omogoča hitrejše sušenje vzorcev smo le-te sušili pri 37 °C. Sušenje je zaradi tega lahko trajalo tudi do 30 minut, odvisno kako zelo natančni smo bili pri odstranjevanju etanola ter vode, predvsem pa tudi od velikosti peleta ter števila vzorcev. Količina mravljične kisline in acetonitrila, ki ju dodajamo posušenemu peletu, je odvisna od velikosti peleta. To pa je lahko problematično, saj imamo v primeru večjega števila vzorcev različne količine dodajanja omenjenih kemikalij. Identifikacija je lahko neuspešna, če dodamo premajhno ali preveliko količino mravljične kisline in acetonitrila. Po dodatku mravljične kisline je po navodilih potrebno previdno mešanje vzorcev, nikakor pa ne tako intenzivno kot pri spiranju z vodo in

etanolom. Mravljična kislina je namreč močna kemikalija, s pomočjo katere dosežemo odvitje beljakovin (Remily-Wood in sod., 2009).

Metoda polne ekstrakcije beljakovin z mravljično kislino je pri večji količini vzorcev lahko precej zamuden postopek, vendar je v primerjavi s konvencionalnimi metodami hitrejši bolj specifičen ter objektivni.

## 5.2 METODA DELNE EKSTRAKCIJE

Cassagne in sodelavci (2011) so v svoji študiji plesni obdelali z metodo delne ekstrakcije. Ta metoda ne vsebuje spiranja z vodo in etanolom kot metoda polne ekstrakcije, prav tako ni potrebno sušenje vzorca. Posledično je metoda delne ekstrakcije tehnično manj zahtevna ter časovno manj obsežna, zato bi lahko bila primerna za identifikacijo v rutinskem laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij.

Od 73-ih izolatov, ki pripadajo vrstam vključenim v knjižnico, smo uspešno smo identificirali 24 izolatov (32,9 %). Rodovi, pri katerih je bila povprečna vrednost »log score« nad 1,7, so naslednji: *Aspergillus* (8/13), *Fusarium* (9/13), *Lichtheimia* (2/6) in *Mucor* (2/5), *Paecilomyces* (1/1) ter *Penicillium* (2/26). Tudi pri tej metodi je bila identifikacija rodov *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum* ter *Cladosporium* neuspešna, kar pomeni, da so povprečne vrednosti »log score« nižje od 1,7.

Cassagne in sodelavci (2011) so v svoji študiji pravilno identificirali 87 % izolatov, 12 % izolatov pa je pripadalo vrstam, ki niso bile vključene v knjižnico in je bila identifikacija neuspešna. Za 1 % izolatov je bila identifikacija napačna. Raziskovalci omenjene študije so ustvarili lastno podatkovno knjižnico, ki je vsebovala spektre, ki so jih pridobili z lastno metodo ekstrakcije torej metodo delne ekstrakcije.

Zaradi inkubacije ter daljšega centrifugiranja je lahko metoda zamudna, vendar manj kot metoda polne ekstrakcije, saj ne vsebuje večkratnega spiranja vzorcev ter sušenja peleta po spiranju. Če ocenimo čas, ki je potreben za izvedbo metode delne ekstrakcije, bi za en vzorec porabili približno 30 minut. Prednost te metode je zagotovo standardizirano dodajanje mravljične kisline in acetonitrila. Tako za razliko od metode polne ekstrakcije vsem vzorcem, ne glede na velikost peleta dodamo enako količino mravljične kisline ter acetonitrila, to je 10 µL.

## 5.3 NEPOSREDNI NANOS

De Carolis in sodelavci (2011) so v svoji študiji z metodo neposrednega nanosa raziskovali identifikacijo naslednjih plesni: Mucorales, *Aspergillus* in *Fusarium*. Ta metoda je bila v naši študiji najkrajša in najenostavnejša glede izvedbe.

Z metodo neposrednega nanosa smo uspešno identificirali 5 izolatov od 73-ih identificiranih, kar predstavlja 6,8 %. Uspešna identifikacija, pri kateri smo dosegli povprečne vrednosti »log score« nad 1,7, je bila pri rodu *Aspergillus* (3/13) ter *Penicillium* (2/26).

Metoda neposrednega nanosa suspendirane kulture na jekleno ploščico je za bakterije uspešna (De Carolis in sod., 2014). V naši raziskavi pa smo pokazali, da je le-ta neprimerna za identifikacijo plesni v diagnostičnih laboratorijih, v primeru uporabe komercialne podatkovne knjižnice. De Carolis in sodelavci (2011) so v svoji študiji pravilno identificirali 96,8 % izolatov. Vendar so v svoji študiji ustvarili lastno podatkovno knjižnico, v katero so vključili masne spektre, ki so jih pridobili prav z metodo neposrednega nanosa.

Največja prednost metode je zagotovo čas, v katerem pridemo do rezultatov, približno 10-15 minut na vzorec ter enostavna izvedba same metode. Negativna stran te metode je bilo le nanašanje etanola na jekleno ploščico, saj ima nizko viskoznost: pri 25 °C, 1,084 mPas (Watson, 2005). Posledično se je lahko kapljica etanola, ki smo jo odpipetirali na določeno pozicijo na ploščici, razlila še na ostale pozicije, kjer je bil nanešen vzorec. Metoda je bila do sedaj testirana predvsem za identifikacijo plesni: Mucorales, *Aspergillus* in *Fusarium*. V diagnostičnem laboratoriju pa za identifikacijo povzročitelja okužbe potrebujemo standardizirano metodo, ki bi bila ustrezna za vse vrste plesni.

#### 5.4 PRIMERJAVA METOD POLNE IN DELNE EKSTRAKCIJE TER NEPOSREDNEGA NANOSA BELJAKOVIN

Če primerjamo izvedbo vseh treh metod, ugotovimo, da je metoda polne ekstrakcije časovno najzamudnejša, vendar po proizvajalčevih navodilih najustreznejša, saj smo z njo dobili največ uspešnih identifikacij, 36,9 %. Postopek ekstrakcije je najenostavnejši pri metodi neposrednega nanosa, vendar smo pri tej metodi dobili najmanj uspešnih identifikacij (6,8 %). Metoda delne ekstrakcije je bila po zahtevnosti izvedbe ter časovnem obsegu med metodo polne ekstrakcije ter neposrednega nanosa. Rezultati, ki smo jih dobili, 32,9 % uspešnost identifikacije, pa so bili primerljivi rezultatom metode polne ekstrakcije.

Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da med metodama polne in delne ekstrakcije beljakovin ni večjih razlik. Dobljena vrednost hi-kvadrat 0,119 je manjša od tabelarične vrednosti 3,841 (SP=1,  $\alpha=0,05$ ,  $p<a$ ). P-vrednost je 0,730 in je tako večja od 0,05. Posledično lahko s 95 % zanesljivostjo trdimo, da med primerjanima metodama ni statistično značilnih razlik.

Med metodama polne ekstrakcije in neposrednega nanosa smo ugotovili statistično značilne razlike. Dobljena vrednost hi-kvadrat je 17,519 in je tako večja od tabelarične

vrednosti 3,841 (SP=1,  $\alpha=0,05$ ,  $p<a$ ). P-vrednost je  $2,845 \cdot 10^{-5}$  in je manjša od 0,05. Metodi se očitno razlikujeta že na prvi pogled in s 95 % zanesljivostjo lahko trdimo, da sta si statistično različni.

Schulthess in sodelavci (2014) so v svoji študiji ocenili komercialno podatkovno knjižnico, ki smo jo uporabili tudi mi. Od 83 izolatov so uspešno identificirali 65 izolatov (»log score« nad 2,000), to je 78,3 %, ter 45 izolatov (54,2 %), kjer je bila »log score« višja od 1,7. V svoji študiji so pokazali, da spreminjanje meje identifikacije (2,0 oziroma 1,7) nima vpliva na zanesljivost identifikacije. Ghosh in sodelavci (2014) so v svoji študiji ugotovili, da je identifikacija enako zanesljiva ne glede ali je meja identifikacije postavljena na 1,7 ali 2,0. Iz teh razlogov smo v naši študiji postavili mejo identifikacije na 1,7.

### 5.5 IDENTIFIKACIJA SEVOV, KI PRIPADAJO VRSTAM, KI NISO VKLJUČENE V PODATKOVNO KNJIŽNICO

Podatkovna knjižnica proizvajalca Bruker zajema masne spektre 127 vrst gliv, od tega 19 vrst gliv rodu *Aspergillus*. Samson in sodelavci (2014) navajajo, da je zaenkrat poznanih 339 vrst gliv rodu *Aspergillus*. Iz tega sledi, da je na področju izdelave knjižnic, ki vsebujejo masne spektre gliv, potrebno še precej dela.

V drugem delu magistrske naloge smo poskusili identificirati 23 izolatov, ki pripadajo vrstam plesni, ki niso vključene v podatkovno knjižnico. Želeli smo ugotoviti ali bomo zaradi pomanjkljive podatkovne knjižnice dobili napačno identificirane izolate. Tako smo želeli testirati specifičnost same metode. Iz preglednice 7 je razvidno, da pri nobenem izolatu nismo dobili napačne identifikacije, kar pomeni, da je metoda visoko specifična.

Rezultati kažejo, da ima 22 izolatov od 23-ih testiranih izolatov, ki pripadajo vrstam, ki niso vključene v podatkovno knjižnico, povprečno vrednost »log score« nižjo od 1,7. Izjema je izolat *N. pseudofischeri*, pri katerem smo z metodo polne ekstrakcije dobili identifikacijo *A. fumigatus* (1,806), z metodo delne ekstrakcije pa *A. thermomutatus* (1,972). V tem primeru ne gre za napačno identifikacijo, saj je *N. pseudofischeri* vključena v podatkovno knjižnico, vendar pod drugim imenom, *A. thermomutatus*, ki je anamorfn oblika zgoraj omenjene plesni (Balajee in sod., 2005). Tudi z metodo polne ekstrakcije nismo dobili napačne identifikacije, saj vse tri omenjene vrste aspergilov spadajo v isto sekcijo. *Aspergillus* sect. *fumigati* namreč vsebuje vrste iz rodu *Aspergillus* in *Neosartorya* (Samson in sod., 2007).

Nekatere vrste plesni so si med seboj tako zelo podobne, da jih je morfološko zelo težko razlikovati, kar lahko predstavlja velik problem tudi izkušenim mikologom. Čeprav sta si plesni *A. fumigatus* in *A. thermomutatus* fenotipsko in filogenetsko zelo podobni, slednja redko povzroča invazivno aspergilozo. Pred nekaj leti so znanstveniki odkrili vrsto plesni *Aspergillus lentulus*, ki ima tako kot *N. pseudofischeri* oziroma *A. thermomutatus* počasno

sporulacijo. Med študijo so ugotovili, da so nekateri izolati *A. fumigatus* izvorno identificirani s pomočjo konvencionalnih metod, pripadali pravzaprav *N. pseudofischeri* oziroma *A. thermomutatus*. Do tega odkritja so prišli s sekvenciranjem dela gena, ki kodira  $\beta$ -tubulin (*benA*) ter gena *rodA*, ki kodira hidrofobin (*rodletA*) (Balajee in sod., 2005). Iz tega sledi, da so konvencionalne metode lahko kljub izkušnjam strokovnjakov manj zanesljive kot sekvenciranje ter masna spektrometrija. To so pokazali tudi Ranque in sodelavci (2014), ki so identificirali 625 plesni z masno spektrometrijo ter konvencionalnimi metodami. Z metodo MALDI-TOF MS so identificirali 89 % izolatov (556), s konvencionalnimi metodami pa 80 % (501) izolatov. V študiji so ugotovili, da je bila identifikacija plesni, ki ne spadajo v rod *Aspergillus*, z MALDI-TOF MS v primerjavi s konvencionalnimi metodami na osnovi morfologije, uspešnejša. Z MALDI-TOF MS so identificirali 61,2 %, s konvencionalnimi metodami pa 30,6 % izolatov plesni, ki ne spadajo v rod *Aspergillus*. Prikazali so, da je uspešnost identifikacije plesni z MALDI-TOF MS v veliki meri odvisna od kvalitete referenčnih spektrov v podatkovni knjižnici ter od števila vrst, ki so zastopane v podatkovni knjižnici.

Pri metodi MALDI-TOF MS je potrebno izpostaviti problem spreminjanja taksonomije ter posodabljanja oziroma nadgrajevanja podatkovnih knjižnic. V naši študiji smo želeli identificirati določene izolate rodu *Lichtheimia*, ki so v podatkovni knjižnici še vedno pod starim imenom. Tak primer je bil izolat *Lichtheimia coerulea*, ki jo v podatkovni knjižnici še vedno najdemo pod imenom *Absidia coerulea*. Prav tako knjižnica ne vsebuje teleomorfne in anamorfne oblike vseh plesni. V primeru *N. pseudofischeri* je v podatkovno knjižnico vključen le anamorf *A. thermomutatus*. Ugotovili smo, da kljub temu, da je v podatkovno knjižnico vključena le anamorfna oblika, MALDI-TOF MS poveže izolat *N. pseudofischeri* z anamorfno obliko.

Becker in sodelavci (2014) so mnenja, da je za izboljšanje zanesljivosti metode potrebna razširitev podatkovne knjižnice. V svoji študiji so imeli namreč 15 izolatov, ki so pripadali vrstam plesni, ki niso bile vključene v podatkovno knjižnico ter jih zato niso mogli identificirati. Treh izolatov, ki so pripadale vrstam plesni, ki so jih dodali v knjižnico niso uspešno identificirali, predvidevajo, da zaradi pomanjkanja znotrajspecifične variabilnosti ustreznih vrst v podatkovni knjižnici.

Posodabljanje podatkovnih knjižnic in njihova razširitev ter previdnost pri interpretaciji rezultatov so ključnega pomena za uspešno in zanesljivo identifikacijo plesni z MALDI-TOF MS. Dejstvo je, da se število glivičnih okužb povečuje na račun staranja prebivalstva pa tudi na račun napredka v medicini. Znanstveniki opozarjajo, da zaradi večjega števila medicinskih posegov, kot so na primer transplantacije krvotvornih matičnih celic oziroma organov, posledično večja število glivičnih okužb (Montagna in sod., 2013; Malani in Kauffman, 2007). Posodabljanje knjižnic pa je pomembno ne le zaradi večanja števila okužb, temveč tudi zato, ker se spreminjajo povzročitelji okužb.

## 5.6 VNOS REFERENČNIH MASNIH SPEKTROV V PODATKOVNO KNJIŽNICO

Izdelava referenčnih masnih spektrov ter izdelava knjižnice je kompleksen in časovno zamuden proces. V naši nalogi smo se izdelave masnih spektrov lotili za izolat plesni, *A. lentulus* CBS 117885. Referenčne masne spektre smo pridobili z metodo polne ekstrakcije z mravljično kislino. Kako uspešni smo bili pri ustvarjanju novega vnosa v podatkovno knjižnico, smo nato preverili s ponovno identifikacijo izolata *A. lentulus* s prej omenjeno metodo ekstrakcije.

Ob ponovni identifikaciji izolatov *A. lentulus* ter *A. fumigatus*, smo pokazali, da je bila leta uspešna, saj smo novo vneseni sev pravilno identificirali. Iz rezultatov je razvidno (preglednica 10), da smo bili pri ustvarjanju referenčnih spektrov in vnosu le-teh v že obstoječo podatkovno knjižnico uspešni, saj nismo dobili napačne identifikacije, temveč smo izolat pravilno identificirali z vrednostmi »log score«, ki so bile nad 2,000. Povprečna vrednost »log score«, ki smo jo tako dobili, je 2,473 in je v primerjavi z identifikacijo ostalih identificiranih izolatov, ki pripadajo vrstam vključenim v knjižnico, najvišja. Izolata plesni *A. fumigatus* sta bila uporabljeni kot kontrola. Želeli smo se prepričati, da bo MALDI-TOF MS prepoznal naše referenčne spektre vrste *A. lentulus*, ki smo jih ustvarili ter jih povezal s pravim izolatom. Cilj je bil torej preveriti, ali bomo s posodobljeno podatkovno knjižnico pravilno identificirali vse tri izolate aspergilov.

Kot sem že omenila, je identifikacija mikroorganizmov v veliki meri odvisna od velikosti in kvalitete podatkovne knjižnice. To je vidno tudi ob primerjavi naših rezultatov z rezultati znanstvenikov, ki so razvili testirani ekstrakcijski metodi. Znanstveniki so dobili veliko višji odstotek uspešnosti identifikacij, vendar so te temeljile na podatkovni knjižnici, ki so jo ustvarili z ekstrakcijsko metodo, ki so jo testirali (De Carolis in sod., 2011; Cassagne in sod., 2011). Naša podatkovna knjižnica, ki smo jo uporabili v študiji, je komercialna podatkovna knjižnica proizvajalca Bruker Daltonik, ki je referenčne spektre plesni pridobil s pomočjo metode polne ekstrakcije z mravljično kislino. Gautier in sodelavci (2014) navajajo, da so lahko razlike pri identifikaciji plesni s pomočjo komercialne podatkovne knjižnice ter lastne podatkovne knjižnice velike. Lau in sodelavci (2013) so se zaradi nizke uspešnosti identifikacije s komercialno knjižnico (0,7 %), odločili, da ustvarijo lastno knjižnico. Tako so uspešnost identifikacije povišali na 88,9 %.

Izbira ustrezne knjižnice ima torej ključno vlogo pri doseganju dobrih rezultatov identifikacij plesni. Kljub vsemu pa ne smemo pozabiti, da je ključ do uspešne priprave knjižnice ter posledično tudi uspešne identifikacije plesni poglobljeno znanje taksonomije gliv.

## 6 SKLEPI

- Identifikacija plesni z metodo MALDI-TOF MS je bila v naši nalogi uspešna v več kot tretjini primerov.
- Z metodo polne ekstrakcije smo uspešno identificirali 36,9 % izolatov, z metodo delne ekstrakcije 32,9 % izolatov, z metodo neposrednega nanosa pa 6,8 % izolatov.
- Med primerjanima metodama polne in delne ekstrakcije, v uspešnosti identifikacije ni statistično značilnih razlik ( $p=0,73$ ).
- Pri identifikaciji plesni z metodo delne ekstrakcije (32,9 %) smo bili v primerjavi z metodo neposrednega nanosa (6,8 %), uspešnejši.
- Specifičnost metode MALDI-TOF MS je visoka, saj od vseh 23-ih izolatov, ki so pripadali vrstam, ki niso bile vključene v knjižnico, nismo dobili napačne identifikacije.
- Za uspešnejšo identifikacijo plesni je potrebno razširiti oziroma nadgraditi komercialno podatkovno knjižnico.

## 7 POVZETEK

Zadnja leta je opazen porast glivičnih infekcij, ki jih povzročajo plesni rodu *Aspergillus* ter glive reda Mucorales. Nevarne so predvsem pri imunsko oslABLjenih bolnikih, pri katerih je uspešna identifikacija povzročitelja mikoze nujna pri izbiri ustreznega antimikotika. Za uspešno zdravljenje mikoz je pri imunsko oslABLjenih bolnikih zgodnja diagnoza ključnega pomena. Identifikacija plesni v diagnostičnih laboratorijih še vedno poteka predvsem s konvencionalnimi metodami, ki temeljijo na morfologiji, torej na makro- in mikroskopskih karakteristikah. Glavna omejitev konvencionalnih metod je časovna, saj je potrebno plesni vzgojiti v čistih kulturah do razvoja diagnostičnih znakov, natančna identifikacija pa sloni na izurjenosti mikologa pri interpretaciji morfoloških znakov, ki pa dandanes še zdaleč niso merilo za razlikovanje med posameznimi vrstami. Ker so te metode odvisne predvsem od rasti in sporulacije gliv, lahko rezultate čakamo tudi do 20 dni ali pa celo več. Morfologija nekaterih vrst plesni je lahko zelo podobna, kar dodatno otežuje njihovo identifikacijo. Masna spektrometrija predstavlja enostavno ter učinkovito rešitev za hitro odkrivanje povzročiteljev okužb. Ker pa imajo glive kompleksnejšo celično steno kot bakterije, je identifikacija z metodo MALDI-TOF MS večji izziv in tako za to vrsto mikroorganizmov še ni uveljavljena v diagnostičnih laboratorijih, saj ni tako zelo uspešna. Danes potekajo številne raziskave, v katerih želijo znanstveniki razviti ekstrakcijsko metodo, ki bo hitra, poceni, tehnično nezahtevna ter učinkovita. Prav tako pa se soočajo s problemom pomanjkljivosti podatkovnih knjižnic, saj so te ključnega pomena pri identifikaciji. Identifikacija plesni je v veliki meri odvisna od izbire podatkovne knjižnice. Znano je, da je identifikacija s pomočjo lastne podatkovne knjižnice veliko uspešnejša kot s komercialno podatkovno knjižnico. V naši študiji smo primerjali tri ekstrakcijske metode, saj smo želeli ugotoviti ali je katera od njih primerna za identifikacijo plesni v diagnostičnem laboratoriju. Rezultati so pokazali, da je od vseh primerjanih metod pri identifikaciji najuspešnejša metoda polne ekstrakcije z mravljično kislino. Ugotovili smo, da metoda delne ekstrakcije ne zaostaja bistveno za metodo polne ekstrakcije. Z metodo neposrednega nanosa, ki je bila časovno ter tehnično najmanj zahtevna, nismo dosegli pričakovanih rezultatov. Na podlagi naših rezultatov lahko trdimo, da so modificirane ekstrakcijske metode manj primerne za uporabo v rutinskih diagnostičnih laboratorijih, od metode priporočene s strani proizvajalca. Glede na rezultate drugih študij lahko sklepamo, da bi modificirane metode lahko bile primerne za diagnostične laboratorije v primeru izdelave lastne knjižnice, katere spektri temeljijo na uporabljeni modificirani metodi. Pomembno je namreč kako je knjižnica ustvarjena ter katera metoda ekstrakcije beljakovin se uporabi za pridobivanje referenčnih masnih spektrov. V drugem delu študije smo testirali specifičnost metode z identifikacijo izolatov, ki so pripadali vrstam, ki jih knjižnica ni vsebovala. Metoda MALDI-TOF MS se je izkazala za visoko specifično, saj so bile dobljene vrednosti nižje od vrednosti, ki nakazujejo uspešno identifikacijo. Prav tako smo ustvarili nov vnos referenčnega masnega spektra vrste *Aspergillus lentulus* v že obstoječo komercialno knjižnico. Identifikacija izolata vrste, ko ta še ni bila vključen v podatkovno



knjižnico, je bila po pričakovanjih neuspešna. Ob vnosu referenčnih spektrov v podatkovno knjižnico ter ponovni identifikaciji sicer istega izolata smo dobili uspešno identifikacijo z visokimi vrednostmi »log score«. Identifikacija plesni z MALDI-TOF MS je cenejša ter hitrejša kot sekvenciranje, prav tako ima večjo specifičnost kot konvencionalne metode. Kljub temu, da smo pričakovali večjo uspešnost pri identifikaciji plesni, smo pokazali, da lahko pravilno identificiramo več kot tretjino plesni. Z nadgradnjo podatkovnih knjižnic se bo odstotek uspešno identificiranih plesni še povešal. Menimo, da je MALDI-TOF MS dobra alternativa konvencionalnim metodam in bo v prihodnosti le-te nadomestila.

## 8 VIRI

- Aimanianda V., Bayry J., Bozza S., Kniemeyer O., Perruccio K., Elluru S. R., Clavaud C., Paris S., Brakhage A. A., Kaveri S. V., Romani L., Latgé J. P. 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460: 1117- 1121
- Alastruey-Izquierdo A., Mellado E., Cuenca-Estrella M. 2012. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1273:18-24
- Anhalt J. P., Fenslau C. 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 47: 219-225
- Atlas R. M. 1995. Handbook of media for environmental microbiology. Boca Raton, CRC Press: 540 str.
- Bader O. 2013. MALDI-TOF MS based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13, 5: 788-799
- Balajee S. A., Gribskov J., Brandt M., Ito J., Fothergill A., Marr K. A. 2005. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5996–5999
- Beauvais A., Bozza S., Kniemeyer O., Henry C., Roberson R. W., Dague E., Chignard M., Brakhage A. A., Romani L., Latgé J. P. 2013. Deletion of the alpha-(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 9, 11: e1003716, doi: 10.1371/journal.ppat.1003716: 15 str.
- Becker P. T., de Bel A., Martiny D., Ranque S., Piarroux R., Cassagne C., Detandt M., Hendrickx M. 2014. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Medical Mycology*, 52, 8: 826-834
- Binder U., Maurer E., Lass-Flörl C. 2014. Mucormycosis - from the pathogens to the disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 6: 60-66
- Blackwell M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98, 3: 426-438
- Bowyer P., Denning D. 2007. Genomic analysis of allergen genes in *Aspergillus* spp.: the relevance of genomics to everyday research. *Medical Mycology*, 45, 1: 17-26

- Brandt E. M., Lockhart S. R., Warnock D. W. 2011. Laboratory aspects of medical mycology. V: Essentials of clinical mycology. 2<sup>nd</sup> ed. Kauffman C. A., Pappas P. G., Sobel J. D., Dismukes W. E. (eds.). New York, Springer Science: 3-27
- Brown G. D. 2011. Innate antifungal immunity: The key role of phagocytes. Annual Review of Immunology, 29: 1-21
- Carrion S. J., Leal S. M., Ghannoum M., Amanianda V., Latgé J. P., Pearlman E. 2013. The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival *in vivo*. Journal of Immunology, 191, 5: 2581-2588
- Cassagne C., Ranque S., Normand A. C., Fourquet P., Thiebault S., Planard C., Hendrickx M., Piarroux R. 2011. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. PLoS ONE, 6, 12: e28425, doi:10.1371/journal.pone.0028425: 9 str.
- Chai L. Y., Netea M. G., Sugui J., Vonk A. G., van de Sande W. W., Warris A., Kwon-Chung K. J., Kullberg B. J. 2010. *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. Immunobiology, 215, 11: 915–920
- Chalupová J., Rausa M., Sedlářová M., Šebela M. 2014. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. Biotechnology Advances, 32: 230-241
- Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. 2011. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 36: 380-407
- De Carolis E., Posteraro B., Lass-Flörl C., Vella A., Florio A. R., Torelli R., Girmenia C., Colozza C., Tortorano A. M., Sanguinetti M., Fadda G. 2011. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical Microbiology and Infection, 18, 5: 475-484
- De Carolis E., Vella A., Vaccaro L., Torelli R., Spanu T., Fiori B., Posteraro B., Sanguinetti M. 2014. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. Journal of Infection in Developing Countries, 12, 8: 1081-1088
- De Respinis S., Vogel G., Benagli C. 2009. MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. Mycological Progress, 109, 4: 1209-1217

- Delaloye J., Calandra T. 2014. Invasive candidiasis as a cause of sepsis critically ill patients. *Virulence*, 5, 1: 161-169
- Desoubeaux G., Bailly É., Chandenier J. 2014. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: updates and recommendations. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44: 89-101
- Farnell E., Rousseau K., Thornton D. J., Bowyer P., Herrick S. E. 2012. Expression and secretion of *Aspergillus fumigatus* proteases are regulated in response to different protein substrates. *Fungal Biology*, 116, 9: 1003-1012
- Fontaine T., Delangle A., Simenel C., Coddeville B., van Vliet S. J., van Kooyk Y., Bozza S., Moretti S., Schwarz F., Trichot C., Aebi M., Delepierre M., Elbim C., Romani L., Latgé J. P. 2011. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 7, 11: e1002372, doi:10.1371/journal.ppat.1002372: 13 str.
- Fontaine T., Simenel C., Dubreucq G., Adam O., Delepierre M., Lemoine J., Vorgias C. E., Diaquin M., Latgé J. P. 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 36: 27591 -27607
- Garnica M., Nucci M. 2013. Epidemiology of fusariosis. *Current Fungal Infection Reports*, 7: 301–305
- Gautier M., Ranque S., Normand A. C., Becker P., Packeu A., Cassagne C., L'Ollivier C., Hendrickx M., Piarroux R. 2014. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 12: 1366–1371
- Ghosh A. K., Paul S., Sood P., Rudramurthy S. M., Rajbanshi A., Jillwin T. J., Chakrabarti A. 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, 4: 372-378
- Goldman D. L., Vicencio A. G. 2012. The chitin connection. *MBio*, 3, 2: e00056-12, doi:10.1128/mBio.00056-12: 4 str.
- Gravelat F. N., Beauvais A., Liu H., Liu H., Lee M. J., Snarr B. D., Chen D., Xu W., Kravtsov I., Hoareau C. M. Q., Vanier G., Urb M., Campoli P., Abdallah Q. A., Lehoux M., Chabot J. C., Ouimet M. C., Baptista S. D., Fritz J. H., Nierman W. C., Latgé J. P., Mitchell A. P., Filler S. G., Fontaine T. Sheppard D. C. 2013. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and

conceals hyphal beta-glucan from the immune system. *PLoS Pathogens*, 9, 8: e1003575, doi:10.1371/journal.ppat.1003575: 17 str.

Guarro J., Orzechowski X., Severo L. C. 2010. Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. V: *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Pasqualotto A. C. (ed.). New York, Springer: 7-27

Hettick J. M., Green B. J., Buskirk A. D., Kashon M. L., Slaven J. E., Janotka E., Blachere F. M., Schmechel D., Beezhold D. H. 2008. Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Biochemistry*, 380: 276–281

Hibbett, D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., Huhndorf S., James T., Kirk P. M., Lücking R., Lumbsch T., Lutzoni F., Matheny P. B., McLaughlin D. J., Powell M. J., Redhead S., Schoch C. L., Spatafora J. W., Stalpers J. A., Vilgalys R., Aime M. C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G. L., Castlebury L. A., Crous P. W., Dai Y.-C., Gams W., Geiser D. M., Griffith G. W., Gueidan C., Hawksworth D. L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R. A., Hyde K., Ironside J. E., Kõljalg U., Kurtzman C. P., Larsson K.-H., Lichtwardt R., Longcore J., Miądlikowska J., Miller A., Moncalvo J.-M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J. D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J. P., Schüßler A., Sugiyama J., Thorn R. G., Tibell L., Untereiner W. A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiß M., White M. M., Winka K., Yao Y.-J., Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111: 509-547

Holland R. D., Wilkes J. G., Rafii F., Sutherland J. B., Persons C. C., Voorhees K. J., Lay J. O. Jr. 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10: 1227–1232

Hornik K. 2015. The R FAQ. R version 2.12.0. Vienna, R foundation: programska oprema <http://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html> (15. jul. 2015)

How to create new database entries\_en. 2015. Bremen, Bruker Corporation: 8 str. (interno gradivo)

Ibrahim A. S., Edwards J. E., Filler Jr. S. G. 2011. Mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis). V: *Essentials of clinical mycology*. 2<sup>nd</sup> ed. Kauffman C. A., Pappas P. G., Sobel J. D., Dismukes W. E. (eds.). New York, Springer Science: 265-281

- Kawel N., Schorer G., Desbiolles L., Seifert B., Marinček B., Boehm T. 2011. Discrimination between invasive pulmonary aspergillosis and pulmonary lymphoma using CT. *European Journal of Radiology*, 77, 3: 417–425
- Kim A. 2010. *Mycoses*. Cleveland, Cleveland Clinic: 16 str.  
<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/infectious-disease/mycoses/Default.htm> (10. apr. 2015)
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. (eds.). 2008. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 10<sup>th</sup> ed. Wallingford, International Mycological Institute: 771 str.
- Kocjan B. J., Poljak M. 2011. Papilomavirusi. V: *Medicinska virologija*. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 41-61
- Krishnana K., Askew D. S. 2014. A regulatory hub for virulence traits in the mold pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*, 5, 2: 334-340
- Križaj I. 2008. *Metode za analizo proteoma*. Ljubljana, Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Inštitut Jožef Stefan: 13 str.  
[http://bio.ijs.si/~krizaj/events/Krizaj\\_pdf1.pdf](http://bio.ijs.si/~krizaj/events/Krizaj_pdf1.pdf) (15. maj 2015)
- Larone D. H. 2011. *Medically important fungi*. 5<sup>th</sup> ed. Washington, ASM Press: 485 str.
- Latgé J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 2: 310–350
- Latgé J. P., Beauvais, A. 2014. Functional duality of the cell wall. *Current Opinion in Microbiology*, 20: 111-117
- Latgé J. P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour fort the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66, 2: 279-290
- Lau F. A., Drakeb S. K., Calhouna L. B., Hendersona C. M., Zelazny A. M. 2013. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 3: 828–834
- Lavigne J. P., Espinal P., Dunyach-Remy C., Messad N., Pantel A., Sotto A. 2013. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51, 2: 257-270

- Lenardon M. D., Munro C. A., Grow N. A. R. 2010. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 416-423
- Malani A. N., Kauffman A. C. 2007. Changing epidemiology of rare mould infections implications for therapy. *Drugs*, 67, 13: 1803-1812
- Malavazi I., Goldman G. H., Brown N. A. 2014. The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi. *Briefings in Functional Genomics*, 13, 6: 456-470
- Matos T. 2002. Oportunistične glive. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 481-499
- Matos T. 2011. Mikologija. V: *Praktikum iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine*. Kotnik V. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo: 179-209
- Meersseman W., van Wijngaerden E. 2007. Invasive aspergillosis in the ICU: an emerging disease. *Intensive Care Medicine*, 33: 1679–1681
- Montagna M. T., Caggiano G., Lovero G., De Giglio O., Coretti C., Cuna T., Iatta R., Giglio M., Dalfino L., Bruno F., Puntillo F. 2013. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection*, 41: 645–653
- Morace G., Borghi E. 2010. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. *Minerva Anestesiologica*, 76, 11: 950–956
- Netea M. G., Brown G. D., Kullberg B. J., Gow N. A. R. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 1: 67–78
- Nishimura K., Ishihara C., Ueki S., Tokura S., Azuma I. 1986. Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine*, 4: 151–156
- Patterson T. F. 2011. Aspergillosis. V: *Essentials of clinical mycology*. 2<sup>nd</sup> ed. Kauffman C.A., Pappas P. G., Sobel J. D., Dismukes W. E. (eds.). New York, Springer Science: 243-261
- Pitt J. I., Hocking A. D. 2009. *Fungi and food spoilage*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Springer: 145-168

- Ranque S., Normand A. C., Cassagne C., Murat J. B., Bourgeois N., Dalle F., Gari-Toussaint M., Fourquet P., Hendrickx M., Piarroux R. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses*, 57, 3: 135-140
- Reese T. A., Liang H. E., Tager A. M., Luster A. D., Van Rooijen N., Voehringer D., Locksley R. M. 2007. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*, 447: 92–96
- Rementería A., López-Molina N., Ludwig A., Vivanco B. A., Bikandi J., Pontón J., Garaizar J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 1-23
- Remily-Wood E., Dirscherl H., Koomen J. M. 2009. Acid hydrolysis of proteins in matrix assisted laser desorption ionization matrices. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20, 11: 2106-2115
- Ribes J. A., Vanover-Sams C. L., Baker D. J. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 2: 236–301
- Russo A., Falcone M., Vena A., Venditti C., Mancini C., Morelli A., Venditti M. 2011. Invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients: analysis of a 14-month prospective clinical experience. *Journal of Chemotherapy*, 23: 290–294
- Samson R. A., Hong S., Peterson S. W., Frisvad J. C., Varga J. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*, 59: 147–203
- Samson R. A., Visagie C. M., Tanney J. B., Varga J., Houbraken J., Kocsube S., Hong S. B., Szigeti G., Yaguchi T., Hubka V., Klaassen C. H. W., Perrone G., Seifert K. A., Susca A., Frisvad J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78: 141-173
- Schulthess B., Ledermann R., Mouttet F., Zbinden A., Bloemberg G. V., Böttger E. C., Hombach M. 2014. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 8: 2797–2803
- Shibuya K., Paris S., Ando T., Nakayama H., Hatori T., Latgé J. P. 2006. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 47: 249-255
- Simčič S., Matos M. 2010. Mikrobiološka diagnostika invazivne aspergiloze. *Zdravstveni Vestnik*, 79: 716-725



- Sodja E., Matos T., Simčič S. 2009. Mikrobiološka diagnostika invazivne kandidoze. *Zdravstveni Vestnik*, 78: 321–327
- Sugar A. M. 2015. Overview of fungal infections. V: Merck manual consumer version. Kenilworth, Merck and the Merck Manuals: 4 str.  
<http://www.merckmanuals.com/home/infections/fungal-infections/overview-of-fungal-infections> (15. feb. 2015)
- Sullivan D., Moran G., Coleman D. 2005. Fungal diseases of humans. V: Fungi biology and applications. Kavanagh K. (ed.). West Sussex, John Willex & Sons Ltd: 171-190.
- Tortorano A. M., Dho G., Prigitano A., Breda G., Grancini A., Emmi V., Cavanna C., Marino G., Morero S., Ossi C., Delvecchio G., Passera M., Cusumano V., David A., Bonaccorso G., Corona A., Favaro M., Vismara C., Garau M. G., Falchi S., Tejada M. R., ECMM-FIMUA Study Group. 2012. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006–2008). *Mycoses*, 55: 73–79
- Van Dyken S. J., Garcia D., Porter P., Huang X., Quinlan P. J., Blanc P. D., Corry D. B., Locksley R. M. 2011. Fungal chitin from asthma-associated home environments induces eosinophilic lung infiltration. *Journal of Immunology*, 5, 187: 2261–2267
- Vega F. M., Fruhwirth G., Ng T., Ridley A. J. 2011. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *Journal of Cell Biology*, 193, 4: ID: 21576392, doi: 10.1083/jcb.201011038: 11 str.
- Vega K., Kalkum M. 2012. Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012: ID 920459, doi.org/10.1155/2012/920459: 10 str.
- Wagner C. J., Huber S., Wirth S., Voehringer D. 2010. Chitin induces upregulation of B7-H1 on macrophages and inhibits T-cell proliferation. *Journal of Immunology*, 10, 40: 2882–2890
- Watson J. T. R. 2005. General physics: Mechanical properties of materials: Viscosities. Online version 1.0. Teddington, National Physical Laboratory: 4 str.  
[http://www.kayelaby.npl.co.uk/general\\_physics/2\\_2/2\\_2\\_3.html](http://www.kayelaby.npl.co.uk/general_physics/2_2/2_2_3.html) (13. jun. 2015)
- Zalar P., Jančič S., Gunde-Cimerman N. 2012. Izbrana poglavja pri predmetu Mikologija., Priročnik za vaje s teoretičnimi osnovami pri izbirnem predmetu za študente Biologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 47 str.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Tadeji Matos dr. med., za sprejetje mentorstva, usmerjanje in pomoč pri nalogi ter za pomoč pri moji nadaljnji karierni poti.

Posebej se želim zahvaliti Roku Tomazinu univ. dipl. mikr., za večni optimizem, vse koristne nasvete, spodbudne besede, predvsem pa za pomoč pri delu, dobro voljo v laboratoriju ter navdušenjem za mikologijo.

Zahvaliti se želim tudi Janji in Tatjani iz laboratorija za diagnostiko glivičnih infekcij, za spodbudne besede, pogovore in življenjske nasvete. Hvala, za topel sprejem v laboratorij, spoznavanje osnov diagnostike gliv in popestritev delavnih dni.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Poloni Zalar, univ. dipl. biol., za pomoč pri oživljanju kultur plesni, asist. dr. Mateji Pirš, dr. med in asist. mag. Marji Furlan, univ. dipl. mikr., za pomoč pri MALDI-TOF MS in izdelavi vnosa seva plesni v knjižnico ter Anji Oštrbenk, univ. dipl. mikr. za pomoč pri statističnem programu R.

Hvala staršem, ker so mi omogočili študij in me podpirali na izbrani študijski poti. Hvala sestri Kaji in prijateljem, za vso oporo in spodbudo. Hvala tudi tebi Miha, ker si vedno verjel vame in mi stal ob strani ter me znal nasmejati tudi v najtežjih trenutkih.

## PRILOGE

**Priloga A: Preglednica vseh uporabljenih sevov ter pripadajoče vrednosti "log score" za metodo polne ekstrakcije beljakovin.**

Plesen	Število izolatov	Sev	Vrednosti "Log score" posameznih sevov pri polni ekstrakciji	Povprečne vrednosti "Log score" pri polni ekstrakciji ( $\pm$ SD)
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	O-G1-1 *	2,117	2,117
<i>A. fumigatus</i>	6	EXF-5898, 5250, 4684, 5457, 5483-1, 4970-1	2,451; 1,697; 2,301; 2,188; 1,993; 2,480	2,185 $\pm$ 0,272
<i>A. nidulans</i>	1	12465-1	1,826	1,826
<i>A. niger</i>	4	4297, 3596-1, 3193-1, 6510	1,887; 2,032; 1,690; 1,635	1,811 $\pm$ 0,158
<i>A. parasiticus</i>	1	2648	1,956	1,956
<i>Cladosporium sp.</i>	1	5129-2	1,597	1,597
<i>C. cladosporioides</i>	2	EXF-1071, EXF-381	1,057; 1,397	1,227 $\pm$ 0,019
<i>Fusarium dimerum</i>	2	EXF-7922, EXF-7060	1,699; 1,737	1,718 $\pm$ 0,220
<i>F. oxysporum</i>	5	15351, 10000-1, 9704 EXF-6324, EXF-5559	1,673; 1,601; 2,197; 1,806; 2,073	1,87 $\pm$ 0,160
<i>F. proliferatum</i>	2	9887, EXF-9394	1,681; 2,017	1,849 $\pm$ 0,050
<i>F. solani</i>	3	5236-2, EFX-5554, EXF-8483	1,679; 1,792; 1,869	1,780 $\pm$ 0,100
<i>F. verticillioides</i>	1	CBS 116665	1,805	1,605
<i>Lichtheimia coerulea</i>	1	CBS 628.70B	1,775	1,775
<i>L. corymbifera</i>	5	14676-1, 12702, N-G1-40, 6477, CBS 120805	1,744; 1,933; 1,875; 1,853; 1,645	1,810 $\pm$ 0,102
<i>Microsporium canis</i>	1	12260-1	1,360	1,360
<i>Mucor circinelloides</i>	4	EXF-4532, EXF-9164, EXF-6296, EXF-8124, 12925-1	1,675; 1,698; 2,105; 1,906	1,846 $\pm$ 0,174
<i>M. ramosissimus</i>	1	CBS 135.65	1,361	1,361
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	CBS 13802	2,028	2,028
<i>Penicillium sp.</i>	15	O-G1, O-G2, O-G3, O-G4, O-G5, O-G6, O-G7, O-G8, O-G9, O-G10, O-G11, O-G1, O-G13, O-G14, O-G15 *	1,653; 1,587; 1,698; 1,533; 1,602; 1,653; 1,559; 1,605; 1,522; 1,598; 1,659; 1,630; 1,687; 1,679; 1,650	1,621 $\pm$ 0,052
<i>P. chrysogenum</i>	3	5219--1, EXF-5904, EXF-5906	1,384; 1,503; 1,712	1,533 $\pm$ 0,135
<i>P. corylophilum</i>	3	13727, EXF-3795, EXF-5893	1,823; 1,655; 1,652	1,710 $\pm$ 0,079
<i>P. crustosum</i>	1	EXF-3872	1,795	1,695
<i>P. glabrum</i>	2	EXF-8017, EXF-8601	1,432; 1,390	1,411 $\pm$ 0,021
<i>P. commune</i>	2	EXF-8119, EXF-8121	1,457; 1,557	1,507 $\pm$ 0,050
<i>Rhizopus microsporus</i>	1	CBS 111563	1,466	1,466
<i>Rhizomucor pusillus</i>	3	EXF-4528, EXF-4436, EXF-4434	1,189; 1,453; 1,645	1,429 $\pm$ 0,186
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1	EXF-7435	1,512	1,512

**Priloga B: Preglednica vseh uporabljenih sevov ter pripadajoče vrednosti »log score« za metodo delne ekstrakcije beljakovin in neposrednega nanosa.**

Plesen	Število izolatov	Sev	Vrednosti "Log score" posameznih sevov pri delni ekstrakciji	Povrečje vrednosti "Log score" pri delni ekstrakciji(±SD)	Vrednosti "Log score" posameznih sevov pri neposrednem nanosu	Povrečje vrednosti "Log score" pri neposrednem nanosu (±SD)
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	O-G1-1 *	1,748	1,748	1,856	1,856
<i>A. fumigatus</i>	6	EXF-5898, 5250, 4684, 5457, 5483-1, 4970-1	1,835; 1,541; 1,819; 1,788; 1,773; 1,750	1,751±0,090	1,853; 1,755; 1,677; 1,621; 1,641; 1,593	1,690±0,089
<i>A. nidulans</i>	1	12465-1	1,412	1,412	1,321	1,321
<i>A. niger</i>	4	4297, 3596-1, 3193-1, 6510	1,723; 1,756; 1,598; 1,611	1,672±0,068	1,278; 1,310; 1,364; 1,452	1,351±0,066
<i>A. parasiticus</i>	1	2648	1,968	1,968	0,000	0,000
<i>Cladosporium sp.</i>	1	5129-2	1,356	1,356	1,499	1,499
<i>C. cladosporioides</i>	2	EXF-1071, EXF-381	1,330; 1210	1,270±0,060	1,303; 1,481	1,392±0,089
<i>Fusarium dimerum</i>	2	EXF-7922, EXF-7060	1,514; 1,308	1,441±0,010	1,689; 1,447	1,566±0,121
<i>F. oxysporum</i>	5	15351, 10000-1, 9704 EXF-6324, EXF-5559	1,753; 1,749; 1,733; 1,701; 1,624	1,712±0,047	1,341; 1,279; 1,153; 1,267; 1,21	1,250±0,064
<i>F. proliferatum</i>	2	9887, EXF-9394	1,859; 1,983	1,921±0,060	1,304; 1,394	1,349±0,045
<i>F. solani</i>	3	5236-2, EFX-5554, EXF-8483	1,671; 1,997; 2,083	1,917±0,177	1,394; 1,570; 1,431	1,465±0,076
<i>F. verticillioides</i>	1	CBS 116665	1,927	1,927	0,000	0,000
<i>Lichtheimia coerulea</i>	1	CBS 628.70B	1,957	1,957	0,000	0,000
<i>L. corymbifera</i>	5	14676-1, 12702, N-G1-40, 6477, CBS 120805	1,773; 1,441; 1,450; 1,431; 1,500	1,519±0,129	1,229; 1,287; 1,347; 1,510; 1,202	1,315±0,110
<i>Microsporium canis</i>	1	12260-1	1,338	1,338	1,265	1,265
<i>Mucor. circinelloides</i>	4	EXF-4532, EXF-9164, EXF-6296, EXF-8124, 12925-1	1,523; 1,607; 1,637; 1,681	1,612±0,057	1,254; 1,349; 1,277; 1,368	1,312±0,048
<i>M. ramosissimus</i>	1	CBS 135.65	1,371	1,371	0,000	0,000
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	CBS 13802	2,019	2,019	1,384	1,384
<i>Penicillium sp.</i>	15	O-G1, O-G2, O-G3, O-G4, O-G5, O-G6, O-G7, O-G8, O-G9, O-G10, O-G11, O-G1, O-G13, O-G14, O-G15 *	1,735; 1,769; 1,302; 1,451; 1,450; 1,399; 1,387; 1,491; 1,453; 1,445; 1,382; 1,480; 1,477; 1,399; 1,670	1,483±0,129	10683; 1,661; 1,698; 1,645; 1,659; 1,668; 1,686; 1,677; 1,685; 1,679; 1,649; 1,683; 2,311; 2,305; 1,621	1,754±0,218
<i>P. chrysogenum</i>	3	5219--1, EXF-5904, EXF-5906	1,677; 1,612; 1,580	1,623±0,040	1,533; 1,444; 1,652	1,543±0,085
<i>P. corylophilum</i>	3	13727, EXF-3795, EXF-5893	1,259; 1,534; 1,476	1,423±0,118	1,393; 1,412; 1,419	1,408±0,011
<i>P. crustosum</i>	1	EXF-3872	1,618	1,618	1,532	1,532
<i>P. glabrum</i>	2	EXF-8017, EXF-8601	1,406; 1,432	1,419±0,013	1,128; 1,428	1,278±0,150
<i>P. commune</i>	2	EXF-8119, EXF-8121	1,457; 1,557	1,423±0,050	1,505; 1,311	1,408±0,097
<i>Rhizopus microsporus</i>	1	CBS 111563	1,327	1,327	1,382	1,382
<i>Rhizomucor pusillus</i>	3	EXF-4528, EXF-4436, EXF-4434	1,277; 1,305; 1,477	1,343±0,088	1,305; 1,424; 1,357	1,362±0,049
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1	EXF-7435	1,261	1,261	1,475	1,475